



Nuevos agentes de control parasitario y vectorial

María Bailén Andrino

2008

Este trabajo ha sido posible gracias a la financiación del Proyecto “Producción Sostenible de Bioplaguicidas Prototipo”. Subproyecto1: Aplicación de procesos químicos y biológicos a la producción y optimización de bioplaguicidas, DGI (CTQ2006-15597-C02-01/PPQ) y al programa de becas predoctorales I3P del CSIC.

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que han contribuido en la realización de esta tesis.

En primer lugar quiero agradecer a mis directores de tesis, Dra. Azucena González Coloma Dr. Rafael A. Martínez Díaz y Dra. Carmen Elisa Díaz Hernández, por sus consejos y su ayuda.

Al ingeniero Jesús Burillo y todo el personal del CITA, por la realización del cultivo de ajeno y suministrarnos las muestras necesarias para poder llevar a cabo esta tesis. A la Universidad de Zaragoza, por la producción de los extractos supercríticos.

Al Dr. Manuel Fraga, por su indispensable participación en la elucidación estructural de productos naturales y en general a todo el personal del IPNA.

A los doctores Jesús Sanz y Ana Cristina Soria por su colaboración en la identificación de compuestos mediante GC-MS, y al Dr. Vicente Aran por su colaboración en la elucidación estructural de compuestos (IQOG).

A los doctores Dr. Raimundo Cabrera Pérez y Cristina Giménez Mariño (UDI de Fisiopatología ULL), por la realización de los ensayos de hongos fitopatógenos.

A Jose M^a Bueno, de la Empresa Hausmann Aromatic, por la donación de los aceites esenciales de ajeno.

Al Dr. Ricardo Molina Moreno, del Laboratorio de Artrópodos del Centro Nacional de Microbiología (ISCIII) por la cesión de la colonia de chinches.

A las siguientes instituciones por su apoyo técnico: CCMA, IPNA, UDI de Fisiopatología ULL, CITA, IQOG.

A todos mis compañeros de laboratorio del CCMA, Marisi, Claudia, Nagla, M^a Jose, Sophien y Lucía, con los que he pasado muy buenos momentos.

A mis amigas Eulalia, Elena, Aida y a mi familia, por darme siempre todo su apoyo. Finalmente, a Carlo, porque sin él no habría podido acabar esta tesis.

Índice

Índice

Introducción y objetivos

1. Antiparasitarios de origen natural	7
1.1. Leishmaniasis	8
1.2. Tripanosomiasis americana	10
2. Otros biomodelos evaluados en este estudio	13
2.1. Insectos	14
2.2. Hongos fitopatógenos	15
3. Plantas seleccionadas para este estudio	16
2.1. Género <i>Persea</i> (Laureaceae)	16
2.2. Género <i>Artemisia</i> (Asteraceae)	19
2.3. <i>Persea indica</i> (L:) Sprengel	22
- Composición química	24
- Actividad biológica	25
2.4. <i>Artemisia absinthium</i> L.	26
- Composición química	28
- Actividad biológica	37
4. Objetivos	40

Material y métodos

1. Técnicas generales	43
1.1. Técnicas instrumentales	43
1.2. Técnicas cromatográficas	44
1.3. Técnicas de extracción	46
2. Material biológico	48
2.1. Material vegetal	48
2.1.1. <i>Persea indica</i>	48
2.1.2. <i>Artemisia absinthium</i>	49

-	Consideraciones geográficas	50
-	Variables controladas	51
-	Recolección y tratamiento de la materia vegetal	51
-	Cultivo del ajeno en condiciones controladas	51
-	Análisis químico	52
-	Poblaciones y muestras de <i>A. absinthium</i>	53
2.2.	Protozoos parásitos	54
2.4.1.	<i>Leishmania infantum</i>	54
2.4.2.	<i>Trypanosoma cruzi</i>	55
2.3.	Insectos diana	56
2.3.1.	Insectos masticadores	56
2.3.2.	Insectos chupadores	57
-	Fitófagos	57
-	Hematófagos	58
2.3.3.	Cría y mantenimiento de los insectos	59
2.4.	Cultivos celulares	60
2.4.1.	Línea celular CHO	60
2.4.2.	Línea celular Sf9	61
2.5.	Hongos fitopatógenos	62
2.6.	Semillas	62
3.	Soluciones, colorantes, reactivos y fármacos de referencia	63
4.	Ensayos de actividad biológica	66
4.1.	Ensayos de actividad antiparasitaria	66
4.2.	Bioensayos con insectos	67
4.2.1.	Bioensayos de comportamiento	67
4.2.2.	Bioensayos de toxicidad	70
4.2.	Ensayos de citotoxicidad	71
4.3.	Bioensayos con hongos fitopatógenos	72
4.4.	Bioensayos de fitotoxicidad	74

5. Fraccionamiento químico biodirigido	75
5.2. <i>Persea indica</i>	75
5.2.2. Obtención del extracto crudo	75
5.2.3. Fraccionamiento	75
5.2.4. Datos físicos y espectroscópicos de los productos aislados	77
5.2.5. Cuantificación de ryanodanos en extractos de hojas, raíces y tallos	81
- Preparación de muestras	81
- Análisis de las muestras	81
5.3. <i>Artemisia absinthium</i>	82
5.3.2. Obtención del extracto crudo	82
5.3.3. Fraccionamiento	82
5.3.4. Datos físicos y espectroscópicos de los productos aislados	85
5.3.5. Cuantificación de flavonas en parte aérea y raíces	95

Resultados y discusión

1. <i>Persea indica</i> L.	99
1.1. Actividad biológica de extractos de raíces, hojas y tallos. Fracciones del extracto crudo de raíces aeropónicas.	100
1.2. Compuestos resultantes del fraccionamiento biodirigido	102
1.2.1. Alquil- γ -lactonas	102
1.2.2. Persananos	109
1.2.3. Ryanodanos e isoryanodanos	117
1.3. Cuantificación de compuestos mayoritarios en hojas, raíces y tallos mediante cromatografía LC-MS.	124
2. <i>Artemisia absinthium</i> L.	129
2.1. Estudio de poblaciones y muestras de ajeno	131
2.1.1. Características de las poblaciones y muestras	132
- Población C (CITA)	132

- Población SN (Sierra Nevada)	134
- Población V (Villacampa)	135
- Muestra H (aceite y fracciones comerciales)	135
2.1.2. Análisis de la composición química de aceites esenciales de <i>A. absinthium</i> por cromatografía de gases- masa (GC-MS)	135
2.1.3. Análisis y cuantificación de los componentes mayoritarios de los extractos de raíz y parte aérea de la población SNC.	144
2.1.4. Actividad biológica de extractos y aceites de las poblaciones y muestras de ajeno.	146
2.1.4.1. Actividad antiparasitaria y citotóxica	147
2.1.4.2. Actividad antialimentaria y repelente de insectos	149
2.1.4.3. Actividad fungicida	155
2.1.4.4. Actividad fitotóxica	158
2.2. Estudio fitoquímico y biológico del extracto de parte aérea de la muestra CE03ExA.	161
2.2.1. Actividad biológica del extracto crudo y las fracciones de la muestra CE03ExA.	161
2.2.2. Compuestos resultantes del fraccionamiento biodirigido.	162
2.2.2.1. Terpenos	162
- Monoterpenos	162
- Diterpenos	165
- Triterpenos	166
- Sesquiterpenos	174
2.2.2.2. Compuestos fenólicos	182
2.2.2.3. Lignanos	191
2.2.2.4. Sinergismo	196

	Índice
Conclusiones	203
Anexos I: Productos identificados	211
Anexo II: Listado de extractos y aceites de <i>Artemisia absinthium</i>	217
Abreviaturas	221

Introducción y objetivos

Introducción y objetivos

Desde la antigüedad, las plantas y sus extractos se han utilizado en el tratamiento de numerosas enfermedades incluyendo las enfermedades parasitarias, así como para combatir las plagas.¹ En los últimos 20-30 años, los estudios científicos han dado un gran empuje al conocimiento de la composición química, la eficacia y los mecanismos de acción de los derivados tradicionales de las plantas. Los productos naturales continúan jugando un papel importante en el proceso de búsqueda y desarrollo de nuevas drogas, principalmente como fuente de nuevas estructuras.² Teniendo en cuenta que menos del 10% de las plantas del mundo han sido estudiadas desde el punto de farmacológico,³ el reino vegetal supone un recurso importante como fuente de potenciales agentes antiparasitarios y plaguicidas.

La tripanosomiasis y la leishmaniasis son una causa considerable de mortalidad y morbilidad en todo el mundo, afectando principalmente a los países en vías de desarrollo. La leishmaniasis es endémica en 88 países, existen 15 millones de casos en todo el mundo, con una incidencia anual de 1.5 a 2 millones de casos y 350 millones de personas en riesgo de contraer la enfermedad.⁴

La tripanosomiasis americana (o Enfermedad de Chagas) es una de las parasitosis más importantes para el hombre, tanto por su prevalencia como por la gravedad de su cuadro clínico. Se estima que existen entre 15 y 18 millones de personas infectadas en Sudamérica, así como 90 millones de individuos expuestos, con más de 50.000 defunciones anuales.⁵ Al margen de estas cifras, no hay que olvidar la repercusión social que acompaña a las enfermedades de carácter crónico. La migración de poblaciones rurales hacia las ciudades y el extranjero han modificado su

¹ Jones, F.A. (1996). Herbs-useful plants. Their role in history and today. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 8: 1227-1231.

² Newman, D.J., Cragg, G.M. (2007). Natural Product as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. *J. Nat. Prod.* 70: 461-477.

³ Editorial. (1994). Pharmaceuticals from Plants: great potencial, few funds. *Lancet.* 343: 1513-1515.

⁴ Desjeux P. (2001). The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *T. Roy. Soc. Trop. Med. H.* 95: 239-243.

epidemiología clásica, haciendo posible su presencia en Estados Unidos y Europa.⁶ Debido a las características actuales de la inmigración en nuestro país, se han detectado casos de esta parasitosis importada y transmisión congénita en distintos puntos de España.^{6,7,8,9}

La tripanosomiasis americana y la leishmaniasis tienen en común ser enfermedades metaxénicas, de manera que al ser transmitidas por un insecto vector, sus medidas de control presentan dos frentes: por un lado el propio agente etiológico, y por otro, los insectos transmisores. Además las posibilidades de control son escasas. Las perspectivas de disponer de una vacuna eficaz son muy remotas, estando actualmente la quimioterapia lejos de paliar las consecuencias de la carencia de una inmunoprofilaxis eficaz. En este sentido, los únicos fármacos disponibles para el tratamiento de la enfermedad de Chagas son los nitroheterociclos, nifurtimox y benzonidazol, ambos de eficacia cuestionable y toxicidad manifiesta.¹⁰ Además de producir índices muy variables de curación (no son eficaces contra todos los estados de la enfermedad ni contra todas las cepas patógenas), requieren ser administrados durante periodos prolongados, con la consiguiente aparición de efectos colaterales adversos, que obligan en muchos casos a interrumpir el tratamiento.

Al margen de la transmisión por vía vectorial, el segundo mecanismo en importancia es la transfusión de sangre infectada. Por el momento, el único compuesto que resulta eficaz como quimioproláctico es el violeta de genciana, de conocido efecto

⁵ Urbina, J. (1999). Parasitological Cure of Chagas Disease: Is it Possible? Is it Relevant? Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 94: 349-355.

⁶ Florián Sanz, F., Gómez Navarro, C., Castrillo García, N., Pedrote Martínez, A., Lage Gallé, E. (2005). Miocardiopatía chagásica en España: un diagnóstico a tener en cuenta. An. Med. Interna. 22: 538-540.

⁷ Muñoz, J., Portús, M., Corachan, M., Fumadó, V., Gascon, J. (2007). Congenital *Trypanosoma cruzi* infection in a non-endemic area. T. Roy. Soc. Trop. Med. H. 101: 1161-1162.

⁸ Salvador, C., Carrilero, B., Iborra, A., Segovia, M. Características clínico-epidemiológicas de tripanosomiasis americana tratadas en la unidad de Medicina Tropical de Murcia. Comunicación PC42. VI Congreso SEMTSi. Segovia 5-7 Marzo 2008.

⁹ Ramos, J.M., Segarra, P., Torrús, D., García Rodríguez, M., García Fabra, X., Martínez Goñi, E., Gutiérrez F., Sanz Vila, R. Enfermedad de Chagas importada en la Comunidad Valenciana. Comunicación PC46. VI Congreso SEMTSi. Segovia 5-7 Marzo 2008.

¹⁰ Docampo, R. (2001): Recent Developments in the Chemotherapy of Chagas Disease. Curr Pharm Design, 7: 1157-1164.

tóxico, y con propiedades colorantes que motivan el rechazo por parte de los pacientes que van a ser transfundidos. En este hecho radica la importancia del desarrollo de moléculas que, aunque no curen la enfermedad, sí tengan efecto tripanocida *in vitro*.

Hoy día, las medidas más eficaces empleadas en la lucha contra la enfermedad pasan por el control químico de los vectores. Estas actuaciones se han mostrado como la mejor alternativa a la hora de reducir la incidencia. En la actualidad se está valorando el efecto de reguladores del crecimiento y fagorrepelentes para el control de reduvídos.¹¹

La Iniciativa del Cono Sur, creada en 1991 por los Ministros de Salud de Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay, así como otras similares creadas posteriormente (Iniciativa de los Andes e Iniciativa de Centroamérica), han conseguido disminuir paulatinamente la prevalencia de esta enfermedad, hasta un total de 9.8 millones de personas infectadas. Estas iniciativas han sido creadas con el fin de interrumpir la transmisión de *T. cruzi*, mediante el control de la transmisión vectorial y transfusional.¹²

Por su parte, la leishmaniasis más que una enfermedad es un amplio grupo de enfermedades distribuidas por todo el mundo. Se estima que hay en el mundo unos 14 millones de personas infectadas, sufriendo desde cuadros cutáneos autorresolutivos hasta procesos viscerales de terminación fatal. La especie presente en España y el resto de la Cuenca Mediterránea, de forma endémica, es *Leishmania infantum*, causante de procesos cutáneos y viscerales, y en su caso como en el resto de las leishmaniasis existe una corto número de fármacos eficaces en el tratamiento (básicamente glucantime, anfotericina B y alopurinol).¹³

A la importancia que este parásito tiene en la sanidad humana se suma su interés veterinario, pues el principal reservorio de la enfermedad es el perro, en el que la infección puede manifestarse de formas muy diversas. La prevalencia media de la

¹¹ Diotaiuti, L.; Penido, C.M.; De Araujo, H.S.; Schofield, C.J., Pinto, C.T. (2000). Excito-repellency effect of deltamethrin on triatomines under laboratory conditions. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., 33: 247-252.

¹² Schofield, C.J., Jannin, J., Salvatella, R. (2006). The future of the Chagas disease control. Trends Parasitol. 22: 583-588.

parasitación en toda Europa puede situarse entre el 5-10 % de la población canina. Sin embargo en algunas zonas llega a alcanzar el 25-35 %.¹⁴

En el tratamiento de las leishmaniasis, tanto humanas como caninas, se emplean los mismos grupos de fármacos (básicamente antimoniales pentavalentes, derivados de las purinas y antibióticos). Por lo general, su eficacia es objeto de discusión, y aunque se producen mejoras clínicas, no existe certeza de curación parasitológica y son frecuentes las recidivas. Hasta 2004 no existía ningún tratamiento oral para esta parasitosis, cuando apareció el miltefosine, un compuesto muy eficaz pero que no se puede usar en niños ni en mujeres embarazadas. Además, ya se están produciendo algunos casos de resistencias, lo que indica que no es el tratamiento ideal: eficaz, oral, seguro y con una relación eficacia/precio adecuada.¹⁵ Esto hace que actualmente se prosiga la búsqueda de principios activos frente al parásito en fuentes tan diversas como la síntesis química, los productos de origen vegetal, e incluso péptidos procedentes de metazoos.^{16,17} Hoy en día se ha intensificado el estudio de dianas parasitarias como son las DNA-topoisomerasas.¹⁵

En cuanto a la lucha contra los insectos vectores para disminuir la población de flebotomos en las áreas a controlar, lo más destacado actualmente es el empleo de insecticidas organofosforados de acción residual (malatión, yodofenós, lindano) en lugares de cría y en lugares de reposo de estos dípteros, especialmente en localizaciones peridomésticas ricas en vegetación.¹⁸

¹³ Alvar, J.; Cañavate, C.; Gutierrez, B.; Jimenez, M.; Laguna, F.; López-Vélez, R.; Molina, R.; Moreno, J. (1997): *Leishmania* and Human Immunodeficiency Virus Coinfection: the First 10 Years. Clin Microbiol Rev, 10: 298-319.

¹⁴ Martínez Moreno, A; Gómez Nieto, C., Hernández Rodríguez, S. (1999). Leishmaniasis canina. En Cordero del Campillo, M. Rojo Vázquez, F.A., Parasitología Veterinaria. Ed. McGraw-Hill Interamericana.

¹⁵ Mishra, J., Saxena, A., Singh, S. (2007) Chemotherapy of Leishmaniasis: Past, Present and Future. Curr. Med. Chem., 14: 1153-1169.

¹⁶ Jacobson, R.L., Schlein, Y. (1999). Lectins and toxins in the plant diet of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) can kill *Leishmania major* promastigotes in the sandfly and in culture. Ann Trop Med Parasitol. 93:351-356.

¹⁷ Fournet, A., Muñoz, V. (2002): Natural Products as Trypanocidal, Antileishmanial and Antimalarial Drugs. Curr. Top. Med. Chem., 2: 1215-1237.

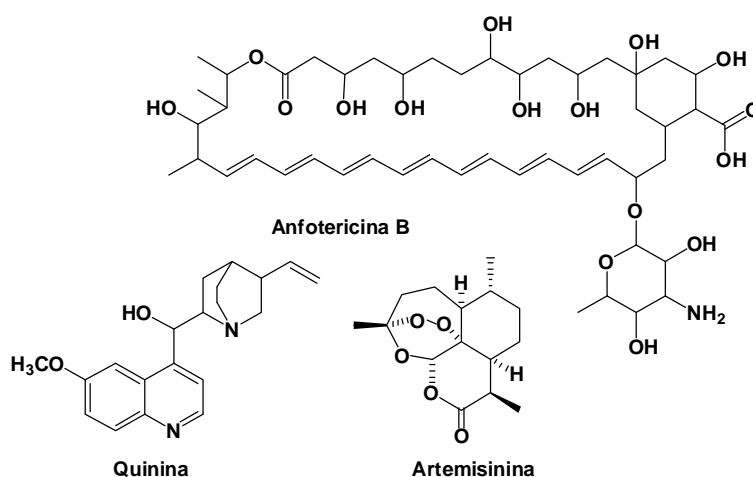
¹⁸ Alexander, B., Maroli, M. (2003). Control of phlebotomine sandflies. Med. Vet. Entomol. 17: 1-18.

La interrupción de la transmisión vectorial de las parasitosis puede suponer una opción más práctica y costo-efectiva al tratamiento de la enfermedad. Es necesario encontrar productos selectivos y biodegradables para reemplazar a los insecticidas que persisten en el medio ambiente y poseen un amplio espectro de toxicidad.¹⁹

1. Antiparasitarios de origen natural

Las plantas constituyen una fuente importante para el descubrimiento de drogas antiparasitarias. A pesar del relativo aumento en la disponibilidad de quimioterapia para las infecciones parasitarias, el incremento del coste del tratamiento en zonas endémicas, la necesidad de una profilaxis adecuada, así como el aumento de las resistencias a los tratamientos tradicionales, justifican la necesidad de encontrar nuevos compuestos que ayuden a combatir este tipo de enfermedades.

El descubrimiento de la quinina aislada de *Cinchona succiruba* (Rubiaceae) y su posterior desarrollo como antimalárico representan un hito en la historia de las drogas antiparasitarias naturales.²⁰ Cabe destacar la reciente incorporación de la artemisinina como antimalárico de origen vegetal y la expansión de la anfotericina B como leishmanicida de origen microbiológico, a modo de ejemplos que validan la importancia actual de los productos naturales como fuente de fármacos antiparasitarios.²⁰



¹⁹ Ujvary, I. (2005). The importance of natural products in insect control. *Pesticidy*. 3: 21-37.

²⁰ Kayser, O., Kiderlen, A.F., Croft, S.L. (2002). Natural products as potencial antiparasitic drugs. En: *Studies in Natural Products Chemistry*. Vol. 26. Bioactive Natural Products (Part G). A. U.Rahman .Ed. Elsevier. Amsterdam. 779-848.

Además los aceites esenciales y sus componentes activos pueden ser utilizados como alternativas conjuntamente con las terapias actuales, ya que algunos aceites pueden modificar la inmunobiología hospedador-parásito por sus propiedades inmunomoduladoras^{21,22} y por su solubilidad lipídica, permitiendo otras rutas alternativas de administración como la transcutánea.

1.1. Leishmaniasis

En la literatura se encuentran descritas un centenar de plantas con actividad leishmanicida. Además de la actividad que presentan los extractos, se han encontrado aceites esenciales con propiedades frente a *Leishmania* spp. Un ejemplo es el aceite de *Croton cajucara*, que produce lisis celular sobre promastigotes in vitro de *L. amazonensis*, así como reducción de los macrófagos infectados. El linalol, principal componente de este aceite esencial, presenta una mayor actividad que el propio aceite esencial en promastigotes y amastigotes.²³

En la tabla 1 se muestran ejemplos de metabolitos secundarios con actividad sobre distintas especies de *Leishmania*, así como su procedencia.

Existen 239 moléculas de origen natural con actividad leishmanicida, que corresponden a distintas clases químicas entre las que encontramos alcaloides, triterpenos, sesquiterpenos, lactonas, quinonas, flavonoides, diterpenos, esteroides, lípidos, iridoides, heterociclos oxigenados, carbohidratos, bencenos, lignanos, cumarinas, fenilpronanoides, prótidos, depsides, monoterpenos.²⁴

²¹ De Oliveira Mendes, S.T. *et al.* (2003). In vitro evaluation of the cytotoxicity of two root canal sealers on macrophage activity. *J. Endod.* 29: 95-99.

²² Chan, M.M-Y. *et al.* (1995). Effects of three dietary phytochemicals from tea, rosemary and turmeric on inflammation-induced nitrite production. *Cancer Lett.* 96: 23-29.

²³ Rosa, M.D.S.S., Mendonça-Filho, R.R., Bizzo, H.R., Rodrigues, I.D.A., Soares, R.M.A., Souto-Pradón, T., Alviano, C.S., Lopes, A.H.C.S. (2003). Antileishmanial activity of linalool-rich essential oil from *Croton cajucara*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47: 1895-1901.

²⁴ Rocha, L.G., Almeida, J.R.G.S., Macêdo, R.O., Barbosa-Filho, J.M. (2005). A review of natural products with antileishmanial activity. *Phytomedicine.* 12: 514-535.

Tabla 1. Productos naturales con actividad leishmanicida

Clase	Compuesto químico	Especie vegetal	Organismo
Quinonas	diospirina ²⁵	<i>Diospyros montana</i>	<i>L. donovani</i>
	antraquinonas 2- carbaldehidos ²⁶	<i>Morinda lucida</i>	<i>L. major</i>
Alcaloides	berberina ²⁷	Annonaceae, Berberidaceae Menispermaceae	<i>Leishmania</i> spp.
	harmalina ²⁸	<i>Peganum harmala</i> <i>Passiflora incarnata</i>	<i>Leishmania</i> spp.
Chalconas	(E)-1-[2,4-hidroxi-3-(3-metilbut-2-enil) fenil]-3-[4-hidroxi-3-(3-metilbut-2-enil) fenil]-prop-2-en-1-ona ²⁹	<i>Piper aduncum</i>	<i>L. donovani</i>
	2,6-dihidroxi-4-metoxichalcona ²⁹		<i>L. amazonensis</i>
	licochalcona ³⁰	<i>Glycyrrhiza</i>	<i>L. major</i> <i>L. donovani</i>
Flavonoides	amentoflavona podocarpusflavona A y B ³¹	<i>Celanodendron mexicanum</i>	<i>L. donovani</i> .
Terpenos	arbortriosides A, B y C ¹⁵	<i>Nyctanthes arbortristis</i>	<i>L. donovani</i>
	6- α -hidroxiloganina ¹⁵		
	amarogentina ³²	<i>Swertia chirata</i>	<i>L. donovani</i>
	partenolida ³³	<i>Tanacetum parthenium</i>	<i>L. amazonensis</i>

²⁵ Hazra, B., Saha, A.K., Ray, R., Roy, D.K., Sur, P., Banerjee, A. (1987). Antiprotozoal activity of diospyrin towards *Leishmania donovani* promastigotes in vitro. Trans R. Soc. Med. Hyg. 81: 738.

²⁶ Sittie, A.A., Lemmich, E., Olsen, C.E., Hvuid, L., Kharazmi, A., Nkrumah, F.K., Christensen, S.B. (1999). Structure-activity studies: In vitro antileishmanial and antimalarial activities of anthraquinones from *Morinda lucida*. Planta Med. 65: 259-261.

²⁷ Vennerstrom, J.L., Lovelace, J.K., Waits, V.B., Hanson, W.L., Klayman, D.L. (1990). Berberine derivatives as antileishmanial drugs. Antimicrob. Agents Chemother. 34: 918-921.

²⁸ Ghosh, A.K., Bhattacharyya, F.K., Ghosh, D.K. (1985). *Leishmania donovani*: Amastigote inhibition and mode of action of berberine. 60: 404-413.

²⁹ Dimmock, J.R., Elias, D.W., Beazely, M.A., Kandepu, N.M. (1999). Bioactivities of chalcones. Curr. Med. Chem. 6: 1125-1149.

³⁰ Lunardi, F., Guzela, M., Rodrigues, A.T., Corrêa, R., Eger-Mangrich, I., Steindel, M., Grisard, E.C., Santos, A.R.S. et al. (2003). Trypanocidal and leishmanicidal properties of substitution-containing chalcones. Antimicrob. Agents Chemother. 47: 1449-1451.

³¹ Sittie, A., Lemmich, E., Olsen, C.E., Hvuid, L., Kharazmi, A., Sauvain, M., Kunesch, N., Dedet, J. (1996). Phytother. Res. 10: 1.

³² Ray, S., Majumder, H.K., Chakravarty, A.K., Mukhopadhyay, S., Gil, R.R., Cordell, G.A. (1996). Amarogentin, a naturally occurring secoiridoid glycoside and a newly recognized inhibitor of topoisomerase I from *Leishmania donovani*. J. Nat. Prod. 59: 27-29.

³³ Tiuman, T.S., Ueda-Nakamura, T., Garcia Cortez, D.A., Dias Filho, B.P., Morgado-Díaz, J.A., De Souza, W., Vataru Nakamura, C. (2005). Antileishmanial activity of parthenolide, a sesquiterpene lactone isolated from *Tanacetum parthenium*. Antimicrob. Agents Chem. 49: 176-182.

Los vectores de la leishmaniasis son dípteros de diversas especies de la familia Psychodidae. Se han descrito numerosos productos naturales con actividad repelente, aunque muy pocos se refieren a estos dípteros, también conocidos como “moscas de la arena”. Un ejemplo es el efecto repelente del aceite esencial *Myrtus communis* sobre la especie *Phlebotomus papatasi*, que además presenta actividad insecticida,³⁴ así como la actividad repelente y antialimentaria del aceite esencial de ajo (*Allium sativum*).³⁵

Por otro lado, se han descrito plantas con actividad insecticida sobre flebotomos como son *Ricinus communis*, *Solanum jasminoides*, *Bougainvillea glabra*, que pueden ser plantadas a modo de barrera como medida alternativa al uso de insecticidas comerciales para el control vectorial.³⁶ Además, extractos de hojas de las especies *Antonia ovata* y *Derris amazonica* han resultado ser insecticidas con *Lutzomyia longipalpis*, otro de los vectores de *Leishmania*.³⁷

1.2. Tripanosomiasis americana

Al igual que en el caso de la leishmaniasis, se han descrito numerosas extractos de plantas y aceites esenciales, así como metabolitos secundarios con actividad tripanocida. El aceite esencial y el extracto obtenidos de *Satureja macrantha* C. A. Mey, son activos frente a epimastigotes de *T. cruzi*.³⁸

En un estudio llevado a cabo sobre 6 especies de Annonaceas colombianas para determinar la actividad antiparasitaria, las especies *Anona murica*, *Rollinia exsucca*, *Rollinia pittieri* y *Xylopia aromatica* presentaron una actividad elevada con epimastigotes de *T.*

³⁴ Yaghoobi-Ershadi, M.R., Akhavan, A.A., Jahanifard, E., Vatandoost, H., Amin, Gh., Moosavi, L., Zahraei Ramazani, A.R. (2006). Repellency effect of Myrtle essential oil and DEET against *Phlebotomus papatasi*, under laboratory conditions. Iranian J. Publ. Health. 35: 7-13.

³⁵ Valero, L., Maroli, M. (2005). Evaluation of repellent and anti-feeding effect of garlic oil (*Allium sativum*) against the bite of phlebotomine sandflies Diptera: Psychodidae. Ann. Inst. Sup. Sanita 41: 253-256.

³⁶ Schlein, Y., Jacobson, R.L., Muller, G.C. (2001). Sandfly feeding on noxious plants: a potencial method for the control of leishmaniasis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 65: 300-303.

³⁷ Luitgards-Moura, J.F., Bermudez, E.G.C., Da Rocha, A.F.I., Tsouris, P., Rosa-Freitas, M.G. (2002). Preliminary assays indicate that *Antonia ovata* (Loganiaceae) and *Derris amazonica* (Papilionaceae), ichthyotoxic plants used for fishing in Roraima, Brazil, have an insecticide effect on *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). Mem I Oswaldo Cruz, 97: 737-742.

³⁸ Saeidnia, S., Gohari, A.R., Hadjiakhoondi, A. (2007). Trypanocidal activity of the essential oil of *Satureja macrantha* and its main volatile components. Int. J. Essent. Oil Ther. 1: 184-186.

cruzi.³⁹ Igualmente, las especies *Anogeissus leiocarpus*, *Terminalia avicennoides*,⁴⁰ *Mikania camporum*, *Mikania micrantha*,⁴¹ entre otras muchas presentan actividad tripanocida. A continuación se muestran algunos ejemplos de metabolitos secundarios de plantas con actividad tripanocida, así como la especie vegetal de la que proceden.

Tabla 2. Productos naturales con actividad tripanocida (*T. cruzi*)

Clase	Compuesto químico	Especie vegetal
Lignanos	(-)-metil-pluviatolida ⁴²	<i>Zanthoxylum naranjillo</i>
	machilin G ⁴³	<i>Nectandra megapotamica</i>
Cumarinas	4-(1-metilpropil)-5,7-dihidroxi-8-(4-hidroxi-3-metilbutiril)-6-(3-metilbut-2-enil)-cromen-2-ona ⁴⁴	<i>Kielmeyera albopunctata</i>
Monoterpenos	Ascaridol y monoterpenos hidroperóxidos relacionados ⁴⁵	<i>Chenopodium ambrosioides</i>
	p-mentano hidroperóxido ⁴⁶	<i>Laurus nobilis</i>
	Aldehídos: limonen-10-al, geranial y neral ⁴⁷	<i>Dracocephalum kotschy</i>
	timol y carvacrol ³⁸	<i>Satureja macrantha</i>
Sesquiterpenos	Dehidroleucodina ⁴⁸	<i>Artemisia douglasiana</i>
	Dehidrocostus lactona y zaluzanina D ⁴⁶	<i>Laurus nobilis</i>
	Sesquiterpeno hidroxiperoxidos ⁴⁹	<i>Pogostemon cablin</i>
Diterpenos	Clerodano diterpeno ⁵⁰	<i>Casearia sylvestris</i>
	Norditerpenoides ⁵¹	<i>Vitex rotundifolia</i>
Quinonas	Emodina y vismiona D ⁵²	<i>Vismia orientalis</i>
	Knifolona ⁵³	<i>Kniphofia foliosa</i>
	1-hidroxibenzoisocromanquinona y 1-acetilbenzoisocromanquinona ⁵⁴	<i>Psychotria camponutans</i>
	Komaroviquinona ⁵⁵	<i>Dracocephalum komarovi</i>
Alcaloides	Camptothecina ⁵⁶	<i>Camptotheca acuminata</i>
	Funiferina ⁵⁷	<i>Gnatteria boliviana</i>
	Ancistrotananzaninas A y B y ancistrotectorilina A ⁵⁸	<i>Ancistrocladus tanzaniensis</i>
	Sarachina ⁵⁹	<i>Saracha punctata</i>
Acetogeninas	Rolliniastatina-1 y esquamocina ⁶⁰	<i>Rollinia emarginata</i>

³⁹ Osorio, E., Arango, G.J., Jiménez, N., Alzate, F., Ruiz, G., Gutiérrez, D. et al. (2007). Antiprotozoal and cytotoxic activities in vitro of Colombian Annonaceae. J. Ethnopharmacol. 111: 630-635.

⁴⁰ Shuaibu, M.N., Wuyep, P.T.A., Yanagi, T., Hirayama, K., Ichinose, A., Tanaka, T., Kouno, I. (2008). Trypanocidal activity of extracts and compounds from the stem bark of *Anogeissus leiocarpus* and *Terminalia avicennoides*. Parasitol. Res. 102: 697-703.

⁴¹ Chaves, J.S., Nascimento, A.M.D., Soares, A.P., De Campos, L.M.P., De Oliveira, P.A., De Albuquerque, S., et al. (2007). Screening of Southeastern Brazilian Mikania species on *Trypanosoma cruzi*. Pharm. Biol. 45: 749-752.

⁴² Bastos, J.K., Albuquerque, S., Silva, M.L. (1999). Evaluation of the trypanocidal activity of lignans isolated from the leaves of *Zanthoxylum naranjillo*. Planta Med. 65: 541-544.

⁴³ Da Silva Filho, A.A., Albuquerque, S., Silva, M.L.A.E., Eberlin, M.N., Tomazela, D.M., Bastos, J.K. (2004). Tetrahydrofuran Lignans from *Nectandra megapotamica* with Trypanocidal Activity. J. Nat. Prod. 67: 42-45.

La enfermedad de Chagas es una zoonosis compleja, principalmente transmitida por insectos hematófagos de la familia Reduviidae. Se han encontrado numerosos aceites esenciales y algunos metabolitos secundarios con actividad repelente e insecticida sobre estos insectos. Como ejemplos se puede citar el aceite esencial de *Pilocarpus spicatus*

- ⁴⁴ Scio, E., Ribeiro, A., Alves, T.M., Romanha, A.J., Shin, Y.G., Cordell, G.A., Zani, C.L. (2003). New bioactive coumarins from *Kielmeyera albopunctata*. J. Nat. Prod. 66: 634-637.
- ⁴⁵ Kiuchi, F., Itano, Y., Uchiyama, N., Ito, M., Honda, G., Tsubouchi, A., Nakajima-Shimada, J., Aoki, T. (2002). Monoterpene hidroperoxides with trypanocidal activity from *Chenopodium ambrosioides*. J. Nat. Prod. 65: 509-512.
- ⁴⁶ Uchiyama, N., Matsunaga, K., Kiuchi, F., Honda, G., Tsubouchi, A., Nakajima-Shimada, J., Aoki, T. (2002). Trypanocidal terpenoids from *Laurus nobilis* L. Chem. Pharm. Bull. 50: 1514-1516.
- ⁴⁷ Saeidnia, S., Gohari, A.R., Uhiyama, N., Ito, M., Honda, G., Kiuchi, F. (2004). Two new monoterpene glycosides and trypanocidal terpenoids from *Dracocephalum kotschyi*. Chem. Pharm. Bull. 52: 1249.
- ⁴⁸ Brengio, S.D. Belmonte, S.A., Guerreiro, E., Giordano, O.S., Pietrobon, E.O., Sosa, M.A., (2000). The sesquiterpene dehydroleucodine (Dhl) affects the growth of cultured epimastigotes of *Trypanosoma cruzi* J. Parasitol. 86: 407-412.
- ⁴⁹ Kiuchi, F., Matsuo, K., Ito, M., Qui, T.K., Honda, G. (2004). New sesquiterpene hidroperoxides with trypanocidal activity from *Pogostemon cablin*. Chem. Pharm. Bull. 52: 1495-1496.
- ⁵⁰ Espindola, L.S., Vasconcelos Junior, J.R., de Mesquita, M.L., Marquie, P., de Paula, J.E., Mambu, L., Santana, J.M. (2004). Trypanocidal activity of a new diterpene from *Casearia sylvestris* var. lingua. Planta Med. 70: 1093-1095.
- ⁵¹ Kiuchi, F., Matsuo, K., Ito, M., Qui, T.K., Honda, G. (2004). New norditerpenoids with trypanocidal activity from *Vitex rotundifolia*. Chem. Pharm. Bull. 52: 1492.
- ⁵² Mbawambo, Z.H., Apers, S., Moshi, M.J., Kapingu, M.C., Van Miert, S., Claeys, M., Brun, R., Cos, P., Pieters, L., Vlietinck, A. (2004). Anthranoid compounds with antiprotozoal activity from *Vismia orientalis*. Planta Med. 70: 706.
- ⁵³ Bringmann, G., Menche, D., Kraus, J., Muhlbacher, J., Peters, K., Peters, E.M., Brun, R., Bezabih, M., Abegaz, B.M. (2002). Atropo-enantioselective total synthesis of knipholone and related antiplasmodial phenylanthraquinones. J.Org. Chem. 67: 5595.
- ⁵⁴ Del Rayo Camacho, Phillipson, J.D., Croft, S.L., Yardley, V., Solis, P.N. (2004). In vitro antiprotozoal and cytotoxic activities of some alkaloids, quinones, flavonoids and coumarins. Planta Med. 70:70-72.
- ⁵⁵ Uchiyama, N., Kabututu, Z., Kubata, B.K., Kiuchi, F., Ito, M., Nakajima-Shimada, J., *et al.* (2005). Antichagasic activity of komaroviquinone is due to generation of reactive oxygen species catalyzed by *Trypanosoma cruzi* old yellow enzyme. Antimicrob. Agents Chemother. 49: 5123-5126.
- ⁵⁶ Bodley, A.L., Shapiro, T.A. (1995). P. Natl. Acad. Sci. USA, 92: 3726-3730.
- ⁵⁷ Mahiou, V., Roblot, F., Fournet, A., Hocquemiller, R. (2000). Bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Gutteria boliviana*. Phytochemistry. 54: 709-716.
- ⁵⁸ Bringmann, G., Dreyer, M., Faber, J.H., Dalsgaard, P.W., Staerk, D., Jaroszewski, J.W., *et al.* (2003). Ancistrotanzanine, 5-8'-linked related compounds from the newly described species *Ancistroladus tanzaniensis*. J. Nat. Prod. 66: 1159-1165.
- ⁵⁹ Moretti, C., Sauvain, M., Lavaud, C., Massiot, G., Bravo, J., Munoz, V. (1998). A novel antiprotozoal aminosteroid from *Saracha punctata*. J. Nat. Prod. 61: 1390-1393.
- ⁶⁰ Fevrier, A., Ferreira, M.E., Fournet, A., Yaluff, G., Inchausti, A., Rojas de Arias, A., Hocquemiller, R., Waechter, A.I. (1999). Acetogenins and other compounds from *Rollinia emarginata* and their protozoal activities. Planta Med. 65:47.

que produce toxicidad sobre ninfas de *Rhodnius prolixus*,⁶¹ el aceite de *Ninthostachys andina* que presenta actividad insecticida sobre ninfas de *R. prolixus* y *Triatoma infestans*,⁶² los aceites esenciales de *Hedeoma mandoniana*, que son insecticidas moderados frente a ninfas de *T. infestans* y *R. neglectus*⁶³ y los extractos etanólicos de las especies *Simarouba versicolor* y *Guarea guidonia*, que tienen propiedades insecticidas sobre ninfas de *R. milesi*.⁶⁴

Por otro lado, se han encontrado lignanos y neolignanos con actividad antialimentaria e inhibidora del crecimiento de *R. prolixus* y *T. infestans*, entre los que se encuentran burchellina, podofilotoxina, pinosresinol, sesamina, licarina A y ácido norhidroguaiarético (NDGA). Burchellina y NDGA además reducen el número de parásitos del tracto digestivo de *R. prolixus*.⁶⁵

2. Otros biomodelos evaluados en este estudio

Además de los insectos de interés sanitario por su papel vectorial en la transmisión de enfermedades, existen otros grupos de insectos de interés agrícola y económico debido a su incidencia sobre cultivos hortícolas. Así mismo, también se ha incluido en este estudio especies de hongos fitopatógenos de interés agrícola, estudios de interacciones alelopáticas, así como ensayos de citotoxicidad con células de insecto y mamíferos (Sf9 y CHO).

⁶¹ Mello C.B., Uzeda C.D., Bernardino, M.V., Medoca-Lopes, D., Kelecom, A., Fevereiro, P.C.A. *et al.* (2007). Effects of the essential oil obtained from *Pilocarpus spicatus* Aint.Hilaire (Rutaceae) on the development of *Rhodnius prolixus* nymphae. *Braz. J. Pharmacogn.* 17: 514-520.

⁶² Fournet, A., Rojas de Arias, A., Charles, B., Bruneton, J. (1996). Chemical constituents of essential oils of Muña, Bolivian plants traditionally used as pesticides, and their insecticidal properties against Chagas disease vectors. *J. Ethnopharmacol.* 52: 145-149.

⁶³ Vilaseca, A., Guy, I., Charles, B., Guinaudeau, H., Rojas de Arias, A., Furnet, A. (2004). Chemical composition and insecticidal activity of *Hedeoma essential* oils. *J. Essent. Oil Res.* 16: 380-383.

⁶⁴ Coelho, A.A.M., De Paula, J.E., Espindola, L.S. (2006). Insecticidal activity of Cerrado plant extracts on *Rhodnius milesi* Carcavallo, Rocha, Galvao & Jurberg (Hemiptera: Reduviidae), under laboratory conditions. *Neotrop. Entomol.* 35: 133-138.

⁶⁵ García, E.S., Azambuja, P. (2004). Lignoids in insects: chemical probes for the study of ecdysis, excretion and *Trypanosoma cruzi*-triatomine interactions. *Toxicon.* 44: 431-440.

2.1. Insectos

De forma general, los insectos se seleccionaron por la importancia económica de su incidencia sobre cultivos hortícolas, su interés vectorial (*R. prolixus*) su capacidad de transmisión de virus (áfidos) así como su disponibilidad y facilidad de cría y mantenimiento en el laboratorio.

La especie *Spodoptera littoralis* es muy polífaga y se conoce por su extrema voracidad. Ataca cultivos de patata, tomate, arroz, tabaco, melón, alfalfa, pimiento y naranjo, entre otros. Las larvas se alimentan tanto de hojas como de las flores y frutos, llegando a alcanzar un marcado gregarismo. Esto, unido a su alta capacidad reproductora y de migración, les confiere una gran importancia económica en Europa y Norte de África.⁶⁶

En cuanto a la especie *Myzus persicae*, el hospedero primario suele ser una planta del género *Prunus*, sobre todo *Prunus persica* (L.), aunque es muy polífago y presenta más de cuarenta familias de hospedadores secundarios, muchas de ellas de elevado interés económico. Es capaz de transmitir más de 100 tipos de virus, entre los que encontramos algunos muy persistentes como el luteovirus del amarilleo occidental de la remolacha, luteovirus del reticulado amarillo de la remolacha, el penamovirus de las excrecencias y mosaico del guisante, o el luteovirus del enrollado de la patata, virus semipersistentes como el closterovirus del amarilleo de la remolacha o el caulimovirus del mosaico de la coliflor, y no persistentes como el virus del mosaico de la alfalfa, el potyvirus latente de la alcachofa, el potyvirus del mosaico amarillo de la judía, el fabavirus del marchitamiento del haba, el potyvirus del mosaico de la lechuga y de la remolacha.^{67,68}

⁶⁶ Balachowsky, A.S. (1972). Entomologie Appliquee a L' Agriculture. Traité Tome II Lèpidopterès. Ed. Masson E T Cie. 1050-1627.

⁶⁷ Kennedy, J.S., Day, M.F., Eastop, V.F. (1962). A conspectus of Aphids as vectors of plant viruses. Commonwealth Institute of Entomology. London. Kennedy, J.S., Day, M.F. and Eastop, V.F. (1962). A conspectus of Aphids as vectors of plant viruses. Commonwealth Institute of Entomology. London.

⁶⁸ Jordá, C., Llácer, G. (1995). Lista de virosis descritas en los distintos grupos de plantas Cultivadas. En: Llácer, G., López, M.M., Trapero, A. y Bello, A., editores. PHYTOMA-España. Valencia.

Al igual que su hospedador primario, es originario de Asia, aunque actualmente se considera cosmopolita.⁶⁹

Igualmente que en el caso anterior, la especie *Rhopalosiphum padi* (L) también conocida como pulgón de la avena, presenta como hospedador primario una planta del género *Prunus*, generalmente *Prunus padus* (L.). En cuanto a su hospedador secundario es bastante polífago. Prefiere las gramíneas, incluidos los cereales y las plantas de pasto. También ha aparecido en otras familias⁷⁰. Es vector de virus vegetales persistentes y algunos no persistentes: BYDV, virus de la hoja manchada del maíz, potyvirus del enanismo amarillo de la cebolla, potyvirus del mosaico enanizante del maíz.⁷¹ Presenta una distribución mundial.

2.2. Hongos fitopatógenos⁷²

En relación a la actividad fungicida se han seleccionado especies del género *Fusarium*. Este género es responsable de muchas enfermedades en los vegetales, como son marchitamiento, podredumbres radicales y de tallos, podredumbre de frutos en general, alteraciones de la madera, etc.

Los daños concretos provocados por las especies empleadas en este trabajo son:

- ***F. solani***: produce la podredumbre seca de los tubérculos de la patata, y causa necrosis en raíces de tomate y berenjena.
- ***F. oxysporum f. sp. lycopersici***: es la especie que más daños causa en los cultivos hortícolas. Además, se conocen muchas formas especializadas, cada una es generalmente un patógeno específico y estricto de una determinada hortaliza. Provoca necrosis en las raíces de las plantas. Los filamentos del micelio llegan al cilindro central de la raíz, se pasan a los vasos conductores y se multiplican

⁶⁹ Blackman, R.L., Eastop, V.T. (1984). Aphids on the world's crops. An identification guide. Ed. Wiley-Interscience Publications

⁷⁰ Rautapää, J. (1970). Preference of cereal aphids for various cereal varieties and species of Graminae, Juncaceae and Cyperaceae. Ann. Agric. Fenn. 9: 267-277.

⁷¹ Belli, G., Corbetta, G., Ostler, R. (1975). Ricerche e osservazione sull'epidemiologia e sulle possibilità di prevenzione del 'gialhume' del riso. Riso. 24: 395-398

⁷² Agrios G.N. (2003). Plant Pathology. 922 pp. Academic Press. San Diego.

rápidamente, formándose en éstos una goma parduzca que dificulta la circulación de la savia, por lo es frecuente que aparezcan marchiteces en la parte aérea del vegetal.

- ***F. moniliforme***: ataca a especies incluidas dentro de los géneros *Allium*, *Avena*, *Cocos*, *Solanum*, *Phoenix*, etc. La infección producida por este hongo se efectúa normalmente a partir de las raíces secundarias que crecen sobre las principales; el hongo asciende hacia las hojas aprovechando los vasos xilemáticos y produciendo de esta forma la infección y colonización de la planta. Además, el hongo produce una serie de toxinas que bloquean el hierro de los citocromos y este último es sustituido por el magnesio; como consecuencia de todo esto aparecen decoloraciones y obstrucción de los vasos xilémáticos, lo que contribuye al marchitamiento y muerte de la planta.

3. Plantas seleccionadas para este estudio

En este trabajo hemos seleccionado especies de los géneros *Persea* y *Artemisia* para el estudio de sus propiedades antiparasitarias e insecticidas junto con el aislamiento y caracterización molecular de sus componentes activos.

3.1. Género *Persea* (Lauraceae)

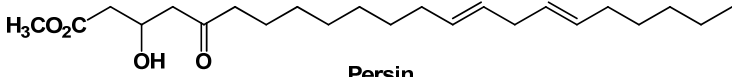
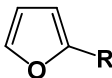
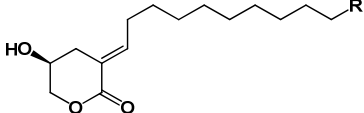
El género *Persea* consta de 150 especies de árboles perennes pertenecientes a la familia de las Lauráceas, distribuidas en las regiones tropicales y subtropicales.

Son árboles que llegan a alcanzar los 15 a 30 m de altura. Ninguna de las especies tolera inviernos severos y todas requieren suelos húmedos.

Las evidencias fósiles indican que este género se originó en el oeste de África durante el Paleoceno, distribuyéndose después en Asia, Sudamérica, Europa y de ahí a Norte América. Se piensa que un cambio gradual del clima durante el Oligoceno y la glaciación de Europa en el Pleistoceno causaron la extinción del género en estas regiones, provocando la actual distribución.

A continuación se presentan algunos ejemplos de las propiedades biológicas de especies del género *Persea* (tabla 3).

Tabla 3. Propiedades biológicas de especies del género *Persea*

Planta	Actividad biológica/compuestos bioactivos
<i>P. americana</i> Miller	<p>Persina: fungicida,⁷³ insecticida,⁷⁴ antialimentario⁷⁵ y tóxico en mamíferos⁷⁶</p>  <p style="text-align: center;">Persin</p> <p><u>Alcanos, alquenos y alquinos:</u> antibacteriana, fungicida, antitumoral e insecticida (hojas y frutos).^{77,78,79} antiparasitaria frente a <i>Trypanosoma cruzi</i> (epimastigotes y tripomastigotes)⁸⁰</p> <p><u>Avocadofuranos:</u> actividad insecticida.⁸¹</p>  <p><u>Flavonol monoglicósidos:</u> kaempferol, quercetin 3-O-α-D-arabipiranosido, afzelina, quercitrina, quercetina y ácido clorogénico: actividad antiviral⁸²</p> <p>Estragol: insecticida⁸³</p>
<i>P. cordata</i> Meisn.	antiinflamatoria, antialérgica, antibacteriana y antiespasmódica (corteza) ⁸⁴
<i>P. major</i> Mill	<p>majoranolida (1): citotóxico y antitumoral⁸⁵</p> <p>majorenolida (2): citotóxico, antitumoral e insecticida⁸⁶</p> <p>majorinolida (3): citotóxico y antitumoral⁸⁶</p>  <div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="margin-right: 10px;"> <p>1 R = $-(CH_2)_3Me$</p> <p>2 R = $-C=CH_2$</p> <p>3 R = $-C\equiv CH$</p> </div> </div>
<i>P. obovatifolia</i> Kost	<p>Neolignan con actividad antitumoral: obovatal, perseal A, perseal B,⁸⁷ obovatifol, obovaten, perseal C y perseal D⁸⁸</p> <p>alcaloides benzilisoquinoleínicos (raíz)⁸⁹</p>
<i>P. podadenia</i> Blake	antipirético, antitusivo, antigripal, uso alimentario (hojas) ⁹⁰

⁷³ Prusky, D., Keen, N.T., Sims J.J., Midland, S.L. (1992). Possible involvement of an antifungal diene in the latency of *Colletotrichum gloeosporioides* on unripe avocado fruits. *Phytopathology*, 72: 1578-1582.

⁷⁴ Chang, C.F., Isogai, A., Kamikado, T., Murakoshi, S., Sakurai, A., Tamura, S. (1975). Isolation and structure elucidation of growth inhibitors for silkworm larvae from avocado leaves. *Agr. Biol. Chem.*, 39: 1167-1168.

⁷⁵ Rodríguez-Saona, C., Millar, J.G., Trumble, J.T. (1997). Growth inhibitory, insecticidal, and feeding deterrent effects of (12Z,15Z)-1-acetoxy-2-hydroxy-4-oxo-heneicosa-12,15-diene, a compound from avocado fruit. *J. Chem. Ecol.* 23: 1819-1831.

⁷⁶ Oelrichs, P.B., Ng, J.C., Seawright, A.A., Ward, A., Schäffeier, L., MacLeod, J.K. (1995). Isolation and Identification of a Compound from Avocado (*Persea americana*) Leaves which Causes Necrosis of the Acinar Epithelium of the Lactating Mammary Gland and the Myocardium. *Nat. Toxins*, 3: 344-349.

⁷⁷ Ye, Q., Gu, Z., Zeng, L., Zhao, G. X., Chang, C.J., McLaughlin, J.L., (1996). Sastrodihardjo, S.Int. *J.Pharmacogn.* 34: 70-72.

El miembro más conocido del género *Persea*, es *P. americana*, que ha sido ampliamente cultivada en las regiones subtropicales gracias a su fruto comestible, el aguacate. Varias partes de esta planta han sido utilizadas en medicina tradicional para numerosas afecciones: infecciones, bronquitis, reumatismo y convulsiones, entre otras. A las hojas de esta planta se les han atribuido propiedades analgésicas y antiinflamatorias.⁹¹ Debido a sus potenciales propiedades biológicas se han realizado numerosos ensayos con el extracto de esta planta, observándose efectos insecticidas, antifúngicos, citotóxicos, antiparasitarios, antibacterianos, anticonvulsivantes,⁹²

⁷⁸ Oberlies, N.H., Lingling, L.R., Martin, J.M., McLaughlin, J.L. (1998). Cytotoxic and Insecticidal Constituents of the Unripe Fruit of *Persea Americana*. J.Nat.Prod. 61: 781-785.

⁷⁹ Domergue, F., Helms, G.L., Prusky, D., Browse, J. (2000). Antifungal Compounds from Idioblast Cells Isolated from Avocado Fruits. Phytochemistry. 54: 183-189.

⁸⁰ Abe, F., Nagafuji, S., Okawa, M., Finjo, J., Akahane, H., Ogura, T., Martínez-Alfaro, M.A., Reyes-Chilpa, R. (2005). Trypanocidal Constituents in Plants. Evaluation of Some Mexican Plants for their Trypanocidal Activity and Active Constituents in the Seeds of *Persea americana*. Biol.Pharm. Bull. 28: 1314-1317.

⁸¹ Rodríguez-Saona, C., Millar, J.G., Maynard, D.F., Trumble, J.T. (1998). Novel Antifeedant and Insecticidal Compounds from Avocado Idioblast Cell Oil. J. Chem. Ecol. 24: 867-889.

⁸² De Almeida, A.P., Miranda, M.M.F.S., Simoni, I.C., Wigg, M.D., Lagrota, M.H.c., Costa, S.S. (1998). Flavonol Monoglycosides Isolated from the Antiviral Fractions of *Persea americana* (Lauraceae) Leaf Infusion. Phytother. Res.12: 562-567.

⁸³ Stein, U., Klingauf, F. (1990). Insecticidal effect of plant extracts from tropical and subtropical species J.Appl.Entomol.110: 160.

⁸⁴ Cechineñ-Filho, V., Zampiro, J.A., Stuzler, H.K., Schempler, V. (2007). Antiespasmodic effects of *Persea cordata* bark fractions on guinea pig ileum. Fitoterapia. 78: 125-128.

⁸⁵ Ma, W., Anderson, J.E., Chang, C.J., Smith, D.L., McLaughlin, J.L. (1990). Majoranolide: A δ -lactone from *Persea major*. Phytochemistry. 29: 2698-2699.

⁸⁶ Ma, W.W., Anderson, J.E., Chang, C.J., Smith, D.L., McLaughlin, J.L.(1989) Majoranolide and Majoranolide: A new pair of cytotoxic and pesticidal alkene-alkyne- δ -lactones from *Persea major*. J. Nat. Prod. 52: 1263-1266.

⁸⁷ Tsai, I.-L., Hiesch, C.-F., Duh, C.-Y. and Chen, I.-S. (1996). Cytotoxic neolignans from *Persea obovatifolia*, Phytochemistry. 43: 1261.

⁸⁸ Tsai, I.-L., Hiesch, C.-F., Duh, C.-Y. (1998). Additional cytotoxic neolignans from *Persea obovatifolia*, Phytochemistry. 48: 1371.

⁸⁹ Tomita, M, Lu, S.-T., and Lan P.-K. (1965). Yakugaku Zasshi. 85: 588.

⁹⁰ Scora, P.E.,Meyer, S., Ahmed, M., Scora, R.W. (1996). Volatile leaf oil composition of *Persea podadenia blake*. J. Essent. Oil Res. 8: 25-28.

⁹¹ Adeyemi, O.O., Okpo, S.O., Ogunti, O.O. (2002). Analgesic and anti-inflammatory effects of some aqueous extracts of *Persea americana* Mill (Lauraceae). Fitoterapia. 73: 375-380.

⁹² Ojewole, J.A.O., Amabeoku, G.J. (2006). Anticonvulsant Effect of *Persea americana* Mill (Lauraceae) (Avocado) leaf Aqueous Extract in Mice. Phytother. Res. 20: 696-700.

hipoglucémicos, hipocolesterolémicos,⁹³ hipotensores⁹⁴ y protectores frente a hepatotoxicidad inducida por paracetamol.⁹⁵

3.2. Género *Artemisia* (Asteraceae)

El género *Artemisia* contiene aproximadamente 350 especies, distribuidas predominantemente por las regiones áridas o de clima continental del hemisferio Norte.⁹⁶ Debido a que las especies del género *Artemisia* suelen ser plantas aromáticas o con compuestos amargos, muchas de ellas se utilizan localmente, tanto como plantas medicinales como en la preparación de licores o en perfumería.

Se ha estudiado la composición química de unas 260 especies de este género, revelando la presencia de muchas clases de metabolitos secundarios, incluyendo terpenoides, flavonoides, cumarinas, glicósidos, esteroides y poliacetilenos. Algunos de estos metabolitos secundarios tienen actividades antimaláricas, antivirales, antitumorales, antipiréticas, antihemorrágicas, anticoagulantes, antioxidantes, anihepatitis, antiulcero-génicas, antiespasmódicas, inductoras del interferón y anticomplemento.⁹⁷ Además, varias de las lactonas sesquiterpénicas que producen, tienen propiedades fungicidas, herbicidas, antimicrobianas o insecticidas, y podrían ser una buena fuente de nuevos pesticidas.⁹⁸

Cabe destacar la importancia de dos especies, *Artemisia pontica* y *Artemisia annua*, que se tratan a continuación.

⁹³ Brai, B.I.C., Odetola, A.A., Agomo, P.U. (2007). Hypoglycemic and Hypocholesterolemic Potential of *Persea americana* Leaf Extracts. J. Med. Food. 10: 356-360.

⁹⁴ Ojewole, Kamadyapa, D.R., Gondwe, M.M., Moodley, K., Musabayane, C.T. (2007). Cardiovascular Effects of *Persea americana* Mill (Laureaceae) (Avocado) Aqueous Leaf Extract in experimental animals. Cardiovasc. J. S. Afr. 18: 69-76.

⁹⁵ Ekor, M., Adepoju, G.K.A., Epoyum, A.A. (2006). Protective Effect of the Methanolic Leaf Extract of *Persea americana* (Avocado) Against Paracetamol-Induced Acute Hepatotoxicity in Rats. International J. Pharm. 2: 416-420.

⁹⁶ Bremer, K. (1994) Asteraceae. Cladistics & Classification. Timber Press, Portland.

⁹⁷ Tan, R.X., Zheng, W.F., Tang, H.Q. (1998). Biologically Active Substances from the Genus *Artemisia*. Planta Med. 64: 295-302.

⁹⁸ Duke, S. O., Paul Jr., R.N., Lee, S.M. (1988). Terpenoids from the Genus *Artemisia* as Potential Pesticides. American Chemical Society Symposium Series. 380: 318-334.

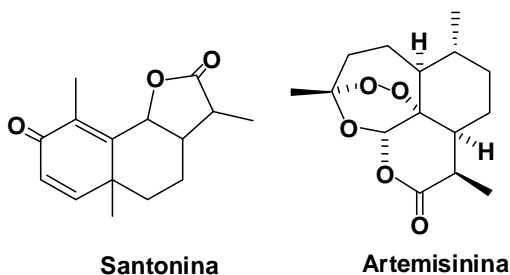
Artemisia pontica

A esta planta se le ha denominado comúnmente ajeno menor y entra a formar parte de la composición de los licores de absenta. Se utiliza en herboristería como aromatizante y para la preparación de otras bebidas amargas. En farmacia, se utiliza por sus propiedades estomacales, estimulantes⁹⁹ y sedantes.¹⁰⁰

En su composición química cabe destacar la santonina, razón por la cual se ha utilizado durante más de 100 años como antihelmíntico. Su uso se ha visto desplazado por nuevos compuestos más efectivos con menores efectos secundarios.¹⁰¹ Su contenido en lactonas sesquiterpénicas ha sido recientemente estudiado.¹⁰²

Artemisia annua

Ampliamente distribuida por la región euroasiática, su uso medicinal es tradicional en la medicina china. Posee una lactona sesquiterpénica, la artemisinina, a la que recientemente se le han atribuido propiedades antimaláricas muy efectivas^{106,103,104}, además de antibacterianas, antiinflamatorias, alelopáticas y antitumorales.⁹⁶



A continuación se presenta una serie de ejemplos de especies del género *Artemisia* con diversos tipos de actividad biológica (tabla 4).

⁹⁹ Chialva, F. Liddle, P.A.P. (1981). Sur la Composition de l'Huile Essentielle de *Artemisia pontica* Linnaeus Cultivé en Piemont. Riv. Ital. EPPOS, LXII (7):350-352.

¹⁰⁰ Todorova, M. N., Tsankova, E.T., Trendafilova, A.B., Gushev, C.V.(1996). Sesquiterpene Lactones with the Uncommo Rotundane Skeleton from *Artemisia pontica* L. Phytochemistry. 41: 553-556.

¹⁰¹ Arnold, W.N., Dalton, T.P., Loftus, L.S., Canan, P.A. (1991). A Search for Santonin in *Artemisia pontica*, the other Wormwood of Old Absinthe. J. Chem. Educ., 68: 27-28.

¹⁰² Trendafilanova, A.B., Todorova, M.N., Gushev, C.V. (1996). Eudesmanolides from *Artemisia pontica*. Phytochemistry. 42: 469-471.

¹⁰³ White, N.J. (1994). Artemisinin: Current Status. T. Roy. Soc. Trop. Med. H., 88, S1:3-4.

¹⁰⁴ Brown, G. D. (1994). Secondary Metabolism in Tissue Culture of *Artemisia annua*. J. Nat. Prod. 57: 975-977.

Tabla 4. Sustancias con actividad citotóxica, antialimentaria de insectos, insecticida y antiparasitaria del género *Artemisia*

Planta	Actividad biológica/compuestos bioactivos
<i>A. abrotatum</i>	antimalárica (bisabolóxido, isoflaxidin) ⁹⁷
<i>A. annua</i>	artemisinina: antimalárico, esquistocida, alelopático, citotóxico, pesticida ^{97,105} pulegona: insecticida, repelente de insectos, herbicida ⁴⁴ aesculetina: pesticida ¹⁰⁶ casticina: antimalárico ¹⁰⁷ artemetina: antimalárico ⁴⁴ crisosplenetina: antimalárico ⁴⁴ crisosplenol-D: antimalárico ⁴⁴ circilineol: antimalárico ⁴⁴
<i>A. afra</i>	repelente de insectos, ¹⁰⁸ herbicida (extracto), ¹⁰⁹ antimalárica (extracto), ¹¹⁰ citotóxica ¹¹¹
<i>A. apiacea</i>	vermífuga ¹¹²
<i>A. atlantica</i>	vermífuga ¹¹³
<i>A. austriaca</i>	repelente <i>Aedes aegypti</i> (9-hidroxi-1,8 cineol) ⁹⁷
<i>A. borealis</i>	larvicida (poliacetilenos) ⁹⁷
<i>A. capillaris</i>	antialimentario(metileugenol, capilina, capilarina) ⁹⁷ regulador del crecimiento de las plantas (capilarol, capilleno) ⁹⁷
<i>A. cina</i>	vermífuga (santonina) ¹¹²
<i>A. douglasiana</i>	pesticida, antialimentario (dehidroleucodina) ¹⁰⁵
<i>A. giraldii</i>	antialimentario, repelente de insectos, insecticida (pinitol) ¹⁰⁶
<i>A. herba-alba</i>	vermífuga, ¹¹⁴ insecticida (aceite esencial) ¹¹⁵
<i>A. judaica</i>	Antihelmíntica, ¹¹³ herbicida, insecticida (piperitona) ¹⁰⁶
<i>A. ludoviciana</i>	antihelmíntica(extracto) ¹¹⁶ , antiprotozoario (extracto) ¹¹⁷
<i>A. maritima</i>	vermífuga (santonina) ¹¹³
<i>A. nilagirica</i>	repelente <i>Culex pipiens quinquefasciatus</i> (capilina) ⁹⁷ antihelmíntica ¹¹⁸
<i>A. parviflora</i>	antimalaria ¹¹⁹
<i>A. princeps</i>	citotóxica (yomogina, jaceosidina, genkwanina, acacetina) ⁹⁷ alelopática ¹²⁰ insecticida, larvicida y antihelmíntico (absintina, isoabsintina) ¹⁰⁶
<i>A. scoparia</i>	antialimentaria (emodina, escopoletina) ¹⁰⁶
<i>A. sieversiana</i>	antihelmíntica ¹¹⁶
<i>A. tridentate</i>	regulador del crecimiento de las plantas (metil jasmonato) ⁹⁷ acaricida, insecticida ¹²¹
<i>A. vulgaris</i>	insecticida, antihelmíntica ^{112,114,116} antiparasitario (β-sitosterol) ¹⁰⁵

¹⁰⁵ Teixeira da Silva, J.A., Yonekura, L., Kaganda, J., Mookdasanit, J., Nhut, D.T., Afach, G. (2004). Important Secondary Metabolites and Essential Oils of Species Within the Anthemideae (Asteraceae). J. Herbs Spices Med. Plants. 11: 1-46.

De los géneros mencionados hemos seleccionado las especies *P. indica* y *A. absinthium* para llevar a cabo los estudios químicos y biológicos que constituyen esta Tesis Doctoral.

3.3. *Persea indica* (L.) Sprengel

Es un árbol perennifolio de crecimiento rápido que puede llegar a alcanzar los 20 m de altura. Pertenece a la familia Lauraceae, su nombre común es el viñátigo y es una especie endémica de Madeira, Azores y Canarias.

La flora de la Macaronesia (Islas Canarias, Madeira y Azores) es un antiguo reducto de la flora de la era Terciaria, un ejemplo gráfico de lo que era la flora de la

¹⁰⁶ Green, M.D., Mount, D.L., Todd, G.D., Capomacchia, A.C. (1995) Chemiluminescent Detection of Artemisinin Novel Endoperoxide Analysis Using Luminol without Hydrogen peroxide. J. Chromatogr. A, 695: 237-242.

¹⁰⁷ Bhakuni, R.S., Jain, D.C., Sharma, R.P., Kumar, S. (2001). Secondary metabolites of *Artemisia annua* and their biological activity. Curr. Science, 80: 35-48.

¹⁰⁸ Libbey, L.M., Turtz, G. (1989). Unusual Essential Oils Grown in Oregon. I. *Artemisia afra* Jacq. J. Essent. Oil Res. 1:29-31.

¹⁰⁹ Ammann, N., & Pieterse, P. J. (2005). Effects of *Artemisia afra* leaf extracts on seed germination of selected crop and weed species. S. Afri. J. Plant Soil. 22: 263-265.

¹¹⁰ Gathirwa, J.W., Rukunga, G.M., Njagi, E.N.M., Omar, S.A., Guantai, A.N., Muthaura, C.N. et al. (2007). In vitro anti-plasmodial and in vivo anti-malarial activity of some plants traditionally used for the treatment of malaria by the Meru community in Kenya. J. Ethnopharmacol. 115: 223-231

¹¹¹ Jenett-Siems, K., Köhler, I., Kraft, C., Beyer, G., Melzig, M. F., Eich, E. (2002). Cytotoxic constituents from *Exostema mexicanum* and *Artemisia afra*, two traditionally used plant remedies. Pharmazie, 57: 351-352.

¹¹² Duke, J.A., Ayensu, E.A. (1985). Medicinal Plants of China. Reference Publishing Inc. Michigan.

¹¹³ Boulou, L. (1983). Medicinal Plants of North Africa. Reference Publishing Inc. Michigan.

¹¹⁴ Font Quer, P. (1962) Plantas Medicinales “El Dioscórides Renovado”. Ed. Labor, Barcelona.

¹¹⁵ Soliman, M. M. M. (2007). Phytochemical and toxicological studies of *Artemisia* L. (compositae) essential oil against some insect pests. Archiv. Phytopathol. Plant Prot. 40: 128-138.

¹¹⁶ Ruiz-Cancino, A., Cano, A.E., Delgado, G. (1993). Sesquiterpene Lactones and Flavonoids from *Artemisia ludoviciana* ssp. Mexicana. Phytochemistry. 15: 1573-1580.

¹¹⁷ Ramos-Guerra, M. C., Mata-Cárdenas, B. D., Vargas-Villareal, J., Sampayo-Reyes, A., González-Salazar, F., Morales-Vallarta, M. et al. (2007). In vitro activity of organic leaf/stem extracts from *Marrubium vulgare* and *Mentha spicata* against *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*. Pharmacologyonline, 1:108-112.

¹¹⁸ Jain, S.K., DeFillips, R.A. (1991) Medicinal plants of India. Reference Publishing Inc. Michigan.

¹¹⁹ Mehrotra, S., Shome, V., Naqui, A.A. (1992) A Preliminary Analysis of the Oils of *Artemisia edgeworthii* Balak and *Artemisia parviflora* Hamm ex. D. Don. J. Essent. Oil Res. 4: 527-529.

¹²⁰ Yun, K.W., Kil, B.S., Han, D.M. (1993). Phytotoxic and antimicrobial activity of volatile constituents of *Artemisia princeps* var. *orientalis*. J. Chem. Ecol. 19: 2757-2763.

¹²¹ Dunkel, F.V., Sears, L.J. (1998). Fumigant properties of physical preparations from mountain big sagebrush, *Artemisia tridentata* Nutt. ssp. *vaseyana* (Rydb.) beetle for stored grain insects. J. Stored. Prod. Res. 34: 307-321.

región Tetiana en la primera mitad del periodo terciario,¹²² que se ha preservado hasta hoy. El bosque de Laurisilva Canario es una comunidad vegetal única, cuyo potencial químico permanece poco estudiado, siendo las especies de árboles dominantes *Laurus azorica*, *P. indica*, *Apollonia barbusana*, *Ilex canariensis* y *Ocotea foetens*.

P. indica requiere clima templado, suelos franco-arcillosos, neutro-ácido, con exposición soleada o media sombra y se multiplica por semillas. Es un elemento del



bosque de laurisilva exigente en cuanto a humedad, por lo que generalmente habita en los lugares más umbríos y de mayor humedad. Presenta un tronco recto y robusto, con la corteza gris oscura, fisurada y ramillas gruesas y frágiles, con pubescencia sedosa. Las hojas son oblongo-lanceoladas o lanceoladas, de 15-18 cm de longitud y 3-4

cm de anchura, coriáceas, de borde entero algo revuelto, con haz de color verde reluciente y envés algo más pálido. El pecíolo tiene de 2-3 cm de longitud con la base ensanchada y tonalidad rojiza.

Las hojas son aromáticas y las flores bisexuales de color amarillo-verdoso están dispuestas en panículas situadas al final de las ramillas, sobre pedúnculos largos cubiertos de tomento gris-amarillento. El fruto bacciforme ovado-elíptico es de 1.5-2 cm de longitud, de color amoratado-negruzco.

Este árbol presenta una apariencia defoliada característica como consecuencia de la acción estacional de la rata silvestre *Rattus rattus* que obtiene tejido cortical, seleccionando las zonas terminales de las ramas, a unos 20 cm del ápice de la rama. Se ha observado que estos animales se intoxican al alimentarse de la planta, llegando en ocasiones a caer de los árboles.¹²³

¹²² Bramwell, D. (1976). Biogeography and Ecology of the Canary Islands (Kunkel, G., ed.), p.207 D.R.W.junk, The Hague.

¹²³ González-Coloma, A., Hernández, M.G., Perales, A., Fraga, B.M. (1990). Chemical Ecology of Canarian Laurel Forest: Toxic Diterpenes from *Persea indica* (Laureaceae). J. Chem. Ecol., 16: 100.

Composición química

De esta planta se han identificado numerosos compuestos de tipo diterpeno polihidroxipentacíclico, en tallos y hojas, y de tipo avocadofurano en frutos y aceite esencial, como se indica en la siguiente tabla.

Tabla 5. Compuestos aislados de *Persea indica*

HOJAS Y TALLOS	FRUTOS
Avocadofuranos ¹²⁴ (aceite esencial de las hojas) avocadienofurano avocadeninofurano	Avocadofuranos ¹²⁴ perseafurano avocadienofurano avocadeninofurano
Ryanodanos ryanodol (mayoritario en tallos) ¹²⁵ cinnzeylanol ¹²³ cinnzeylanina ¹²⁶ cinnzeylanona ¹²⁷ ryanodol 14-monoacetato ¹²⁷ epi-cinnzeylanol ¹²⁷ anhidrocinnzeylanona ¹²⁸ garajonona ¹²⁸ 2,3-didehidrocinnzeylanona ¹²⁸ anhidrocinnzeylanina ¹²⁹	
Isoryanodanos: indicol ¹³⁰ vignaticol ¹²⁸ perseanol ¹²⁸	
Alkeno-γ-lactona: Majorenolida ¹²⁴	

Los avocadofuranos avocadienofurano, y avocadeninofurano han sido obtenidos previamente de *P. americana*¹³¹ y *Elodea canadensis*¹³² respectivamente. En cuanto al

¹²⁴ Fraga, B.M., Terrero, D. (1996). Alkene- γ -lactones and avocadofurans from *Persea indica*: a revision of the structure of majorenolide and related lactones. *Phytochemistry*, 41: 229-232.

¹²⁵ González-Coloma, A., Cabrea, R., Socorro Monzón, A.R., Fraga, B.M. (1993) *Persea indica* as a natural source of the insecticide ryanodol. *Phytochemistry*. 34: 397-400.

¹²⁶ Isogai, A., Suzuki, A., Tamura, S., Murakoshi, S., Ohashi, Y., Sasada Y. (1976). Structures of cinnzeylanine and cinnzeylanol, polyhydroxylated pentacyclic diterpenes from *Cinnamomum zeylanicum* Nees. *Agric. Biol.Chem.* 40: 2305-2306.

¹²⁷ González-Coloma, A., Terrero, D., Perales, A., Escoubas, P., Fraga, B.M. (1996). Insect antifeedant ryanodane diterpenes from *Persea indica*. *J.Agric. Food Chem.* 44, 296-300.

¹²⁸ Fraga, B.M., Terrero, D., Gutiérrez, C., González-Coloma, A. (2001). Minor diterpenes from *Persea indica*: their antifeedant activity. *Phytochemistry*. 56: 315-320.

¹²⁹ Yagi, Tokubuchi, N., Nohara, T., Nonaka, G., Nishioka, I., Koda, A. (1980). The constituents of cinnamon cortex. I. Structures of cinnassiol A and its glucoside. *Chem. Pharm. Bull.* 28: 1432-1436.

cinnceylanol y la cinnzeylanina, han sido previamente aislados de la corteza de *Cinnamomum zeylanicum* (Lauraceae).^{126,129,133}

Actividad biológica

Tradicionalmente las hojas de *P. indica* se usaban para proteger de las plagas a las patatas almacenadas, lo que sugiere propiedades insecticidas.

Por otro lado, extractos de *P. indica* han mostrado actividad antialimentaria e inhibidora del crecimiento frente a los insectos *Macaronesia fortunata* (Lepidoptera: Lymantriidae) y *Heliothis armigera*, *Spodoptera litura*, *S. littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae)¹³⁴ y *M. persicae* (Homoptera: Aphididae),¹³⁵ donde además de la inhibición del crecimiento se detectó actividad antialimentaria. También en los ensayos realizados con *Reticulitermes speratus* (termitas) se observó actividad antialimentaria.¹³⁶

Los tallos y las hojas de *P. indica* son tóxicos para insectos y mamíferos debido a su contenido en diterpenos, mientras que los frutos no contienen diterpenos tóxicos sino avocadofuranos.^{124,137}

Se han realizado estudios con el extracto etanólico de *P. indica* en cobayas y ratones, observándose efectos sobre la musculatura lisa y la presión sistémica, por sus propiedades tipo serotoninérgico y análogas a la papaverina.¹³⁸ También se ha producido

¹³⁰ Fraga, B.M., González-Coloma, A., Gutiérrez, C., Terrero, D. (1997). Insect antifeedant isoryanodane diterpenes from *Persea indica*. J. Nat. Prod.60: 880-883.

¹³¹ Malghaes Aves, H., Coxon, D.T., Falshaw, C.P., Gotfredsen, W.O., Ollis, W.D. (1970). An. Acad. Brasil Cienc, 42: 45.

¹³² Previtera, L. Merla, D., Monaco, P. (1985). Acetogenins from the aquatic plant *Elodea canadensis* Phytochemistry. 24: 1838.

¹³³ Isogai, A., Murakoshi, S., Suzuki, A., Tamura, S. (1972). Agric. Biol. Chem. 41: 1779.

¹³⁴ González-Coloma A., Cabrera, R., Castañera, P., Gutiérrez, C., Fraga, B.M. (1992). Insecticidal activity and diterpene content of *Persea indica*. Phytochemistry. 3: 1549-1552.

¹³⁵ González-Coloma, A., Reina, M., Gutiérrez, C., Fraga, B.M. (2002). Natural insecticides: structure diversity, effects and structure-activity relationships. A case study. En: Studies in Natural Products Chemistry. Vol. 26. Bioactive Natural Products (Part G). A.U.Rahman. Elsevier. Amsterdam. 849-857.

¹³⁶ González-Coloma A., Escoubas, P., Reina, M., Mizutani, J. (1994). Antifeedant and insecticidal activity of endemic Canarian Laureaceae. Appl. Entomol. Zool. 29: 292-296.

¹³⁷ Pino, J.A., Fernandes, P., Marbot, R., Rosado, A., Fontinha, S.S. (2004). Leaf Oils of *Helichrysum melaleucum* Rchb. ex Holl., *Oenanthe divaricata* (R.Br.) Mabb. and *Persea indica* (L.) Spreng. from Madeira. J. Essent. Oil Res.16: 487-489.

¹³⁸ Braghiroli, L., Mazzanti, G., de Feo, G., Palmery, M. (1992). Further Pharmacological Investigations on *Persea indica*. Ars Pharmaceutica. 33,1-4-Part II, 531-534.

toxicidad letal en ratones que fueron inyectados con extractos de *P. indica*.¹²³ Los compuestos que se han aislado de esta planta han sido estudiados para determinar su actividad insecticida:

- El **ryanodol**, en contraste con su derivado alcaloidal ryanodine (insecticida comercial), presenta una baja toxicidad en ratones y es un potente agente insecticida con cucarachas y moscas.¹³⁹
- El **cinnzeylanol** presenta actividad insecticida, produciendo ecdisis anormales en larvas de *Bombix mori*.¹³³ Este compuesto, como su análogo ryanodol presenta toxicidad selectiva entre artrópodos y ratones. Además, tanto el **cinnzeylanol** como la **cinnzeylanina**, han resultado tener actividad anticomplemento¹²⁹ y toxicidad frente a diversas especies de insectos.¹⁴⁰

Tanto los ryanodanos como los isoryanodanos aislados de *P.indica*, son antialimentarios, en ensayos con *S. litura*,^{127,130} *S.littoralis* y *Leptinotarsa decemlineata*. Se ha observado que la actividad insecticida se produce de forma selectiva¹⁴¹ y mediante un mecanismo de acción no neuronal.¹⁴²

Todo esto nos lleva a concluir que *P. indica* es una potencial fuente de agentes para el control de insectos, aunque sus efectos antiparasitarios se desconocen.

3.4. *Artemisia absinthium* L.

Artemisia absinthium, denominada comúnmente ajenojo, es una planta vivaz de cepa leñosa. Cada año produce desde su base ramas rectas, de 0.50 a 1.20 m de altura, que se secan en otoño tras la fructificación. Las partes basales de estas ramas permanecen durante el invierno y en la estación siguiente se producen nuevas ramas a

¹³⁹ Waterhouse, A.L., Pessah, I.N., Francini, A.O., Casida, J.E. (1987). Structural Aspects of Ryanodine action and Selectivity. J. Med. Chem. 30: 710.

¹⁴⁰ Isogai, A., Murakoshi, S., Suzuki, A., Tamura, S. (1977). Chemistry and biological activities of cinnzeylanine and cinnzeylanol, new insecticidal substances from *Cinnamomum zeylanicum*. Agric. Biol. Chem. 41: 1779-1784.

¹⁴¹ González-Coloma, A., Gutiérrez, C., Hübner, H., Achenbach, H., Terrero, D., Fraga, B.M. (1999). Selective Insect Antifeedant and Toxic Action of Ryanoid Diterpenes. J. Agric. Food Chem. 47: 4419-4424.

partir de sus yemas. Toda la planta tiene una coloración blanquecina, debido a su abundancia de pelos que cubren prácticamente toda la superficie de tallo y hojas.¹¹³



El área de distribución del ajeno abarca desde Asia Central hasta Europa Occidental, con algunas localidades en el Norte de África. Dado que ha sido una planta muy cultivada por su carácter aromático, su área de distribución original es difícil de definir y diversos autores plantean la posibilidad de que se trate de un elemento naturalizado de antiguos cultivos en una buena parte de su área de distribución actual, al menos en el continente europeo.¹⁴³

Es posible que su presencia en algunas localidades peninsulares se deba también a naturalizaciones de antiguos cultivos.^{113,144,145}

Como planta aromática, el ajeno se cultiva en países como los Estados Unidos, la antigua URSS y Francia.^{146,147} La planta se recolecta cuando está en plena floración, entre julio y agosto. El primer año la recolección es escasa, pero en los años sucesivos es posible hacer dos recolecciones, en julio y a finales de octubre, si las condiciones meteorológicas lo permiten.

Aunque la forma más común de obtener el ajeno que se comercializa son los cultivos, en muchos lugares se recogen poblaciones silvestres de esta planta, obteniéndose así un producto heterogéneo en calidad y rendimiento. También se han

¹⁴² Pessah, I.N. (1989). Recent Advances in the Chemistry of Insect Control II (Crombie, L., ed), 278. Royal Society of Chemistry, London.

¹⁴³ Meusel, H., Jäger, E.J. (1992). Vergleichende Chorologie der zentraleuropäischen Flora. Vol III. Ed. Gustav Fischer, Germany.

¹⁴⁴ Pardo, J. (1985) Catálogo o Enumeración de las Plantas de Torrecilla de Alcañiz Así Espontáneas como Cultivadas. (Ed. Facs. Diputación de Teruel, 1995).

¹⁴⁵ Villar, L., Palacin, J.M., Calvo, C., Gómez, D., Monserrat, G. (1987). Plantas Medicinales del Pirineo Aragonés y Demás Tierras Oscenses. Ed. Diputación de Huesca.

¹⁴⁶ Guenther, E. (1975). The essential Oils, Vol. V, R.E. Krieger Publ. Company, Huntintong, New York.

¹⁴⁷ Hornok, L. (1992). Cultivation and Processing of Medicinal Plants. John Wiley & Sons, Chichester, UK.

desarrollado métodos de micropropagación de ajeno para producir plantas con el fin de obtener metabolitos secundarios.¹⁴⁸

Composición química

De entre los numerosos compuestos que se han identificado en el ajeno (tabla 6), vamos a centrar nuestra atención en los grupos de compuestos más ampliamente estudiados y con un mayor significado quimitaxonómico: las lactonas sesquiterpénicas y los compuestos terpénicos que forman el aceite esencial.

Artemisia absinthium se caracteriza por la presencia de lignanos tipo sesamina que representan un grupo de fenilpropano dímeros que contienen dos anillos tetrahydrofuránicos unidos.¹⁴⁸ La acumulación de lignanos tetrahydrofuránicos, así como la presencia de polycetilenos en plantas del grupo de *Artemisia absinthium* resulta tener una considerable relevancia sistemática.^{149,150,151} Además estos lignanos poseen ciertas propiedades insecticidas y medicinales.¹⁵⁰

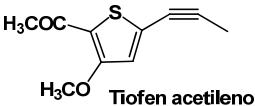
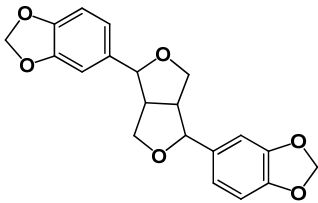
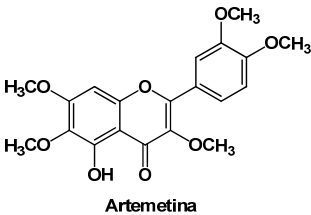
¹⁴⁸ Nin, S., Schijj, S., Bennici, A., Magherini, R. (1994). In vitro Propagation of *Artemisia absinthium* L. Adv. Hort. Science. 8: 145-147.

¹⁴⁹ Greger, H. (1979). Polyacetylene and Sesamines as chemical characters in the *Artemisia absinthium* group. Planta Med. 35: 84-91.

¹⁵⁰ Greger, H, Hofer, O. (1980). New unsymmetrically substituted tetrahydrofurofuran lignans from *Artemisia absinthium*. Tetrahedron. 36: 3551-3558.

¹⁵¹ Greger, H. (1981). Sesamin-type Lignans as Chemical Markers within *Artemisia*. Biochem. Syst. Ecol. 9: 165-169.

Tabla 6. Compuestos aislados de *Artemisia absinthium*.

Clase	Compuestos aislados
Poliacetilenos ^{149,152}	Tiofenos, anillo-enoleters <div data-bbox="858 376 1114 481">  <p>Tiofen acetileno</p> </div>
Lignan tetrahidrofuranicos ^{149,150,151}	Sesamina <div data-bbox="826 533 1145 734">  </div> <p>tipo asantina (asantina, epiasantina) tipo yangambina (yangambina, epiyangambina, diayangambina) tipo sesartemina (sesartemina, episesartemina a y b, diasesartemina)</p>
Flavonoides ^{153,154,155}	artemetina , isorhamnetina, narcisina flavonol glucósidos <div data-bbox="817 884 1129 1097">  <p>Artemetina</p> </div>
Oligosacáridos ¹⁵⁶	
Ácidos fenólicos ^{157,158}	ácido caféico, ácido clorogénico, ácido ferúlico, ácido p-hidroxibenzoico, ácido vainílico, ácido p-hidroxifenilacético

¹⁵² Yamari, A., Boriky, D., Bouamrani, M.L., Blaghen, M., Talbi, Mohammed. A new thiophen acetylene from *Artemisia absinthium* (2004). J. Chinese Chem. Soc. 51: 637-638.

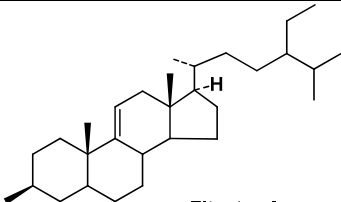
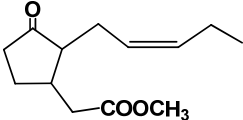
¹⁵³ Cekan, Z., Herout, V. (1955). Plant substances. IV. Isolation of 5-hydroxy-3,3',4',6,7-pentamethoxyflavone from *Artemisia absinthium* L. Chemické Listy Veda a Průmysl. 49: 1053-1056.

¹⁵⁴ Hoffmann, B., Herrmann, K. (1982). Flavonol glycosides of mugwort (*Artemisia vulgaris* L.), tarragon (*Artemisia dracunculoides* L.) and absinth (*Artemisia absinthium* L.) - 8. Phenolics of Spices. Z. Lebensm. Unters. For. 174: 211-215.

¹⁵⁵ Sal'nikova, E.N., Kalinkina, G. I., Dmitruk, S.E. (2001). Chemical investigation of flavonoids of bitter wormwood (*Artemisia absinthium*), Sievers' wormwood (*A. sieversiana*) and Yakut wormwood (*A. jacutica*). Khim. Rstisl'nogo Syr'ya. 3: 71-78.

¹⁵⁶ Kennedy, J.F., Stevenson, D.L., White, C.A., Lombard, A., Buffa, M. (1988) Analysis of the Oligosaccharides from the Roots of *Arnica montana* L., *Artemisia absinthium* L. and *Artemisia dracunculoides* L. Carbohydr. Polym. 9: 277-285.

¹⁵⁷ Swiatek, L., Dombrowicz, E. (1984). Phenolic acids in bitter drugs. Part I. Examination of absinth herb and gentian root. Ins. Badania Srodowiska Bioanal., Akad. Med., Lodz, Pol. Farmacja Polska. 729-32.

Clase	Compuestos aislados
Carotenoides, taninos y ácido ascórbico ¹⁵⁹	
Esteroles ¹⁶⁰	 <p style="text-align: center;">Fitosterol</p>
Cumarinas ^{152,161}	escpoletina, umbeliferona, esculetina, esculina
Metil jasmonato ¹⁶²	sustancia promotora de la senescencia
	 <p style="text-align: center;">COOCH₃</p>
Terpenos	<p>peróxidos homoditerpénicos¹⁶³</p> <p>Monoterpenos^{164 165}</p> <p>pineno, tuyeneno, fencheno, camfeno, sabineno, mirceno, acetato de crisantenilo, acetato de bornilo, tuyona, cineol...</p> <p>Sesquiterpenos^{161,162} (Selineno, cariofileno, β-bisabolol)</p> <p>Lactonas sesquiterpénicas</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ fulveno hidrocarburos, camazulenos¹⁶⁶ ▪ artabsina,^{167,168} absintina,^{168,169} isoabsintina,¹⁷⁰ absintolida,¹⁷¹ anabsina¹⁷², matricina,¹⁷³ anabsintina,¹⁷⁴ artabina,¹⁷⁵ arsubina,¹⁷⁶ absindiol,¹⁷⁷ artemoline,¹⁷⁸ arabsina,¹⁷⁹ artabsintolidos A-D,¹⁸⁰ artenólido,¹⁸¹ deacetilglobicina¹⁷² ▪ parishin b y c¹⁸² ▪ cetopelenólido A-D,¹⁸³ hidroxicetopelenólido¹⁷⁷

¹⁵⁸ Sal'nikova, E.N., Komissarenko, N.F., Derkach, A.I., Dmitruk, S.E., Kalinkina, G.I. (1993) Phenolic Acids of Wormwoods of the Order Frigidae. Chem. Nat. Compd. 29: 678.

¹⁵⁹ Gilani, A.U. H., Janbaz, K.H. (1995). Preventive and Curative Effects of *Artemisia absinthium* on Acetaminophen and CCL₄-induced Hepatotoxicity. Gen. Pharmacol. 203: 332-335.

¹⁶⁰ Sayed, M.D., Soliman, F.M., El-Shawry, A.M., El-Shawry, A.O. (1980). Sterols of *Artemisia absinthium*. Egypt. J. Pharm. Sci. . 19: 323-327.

¹⁶¹ Sal'nikova, E.N., Komissarenko, N.F., Dmitruk, S.E., Kalinkina, G.I. (1992). Coumarins of wormwoods of the Frigidae series. Chem. Nat. Compd. 28: 115.

¹⁶² Ueda, J., Kato, J. (1980) Isolation and Identification of a Senescence promoting substance from Wormwood (*Artemisia absinthium* L.). Plant Physiol. 66: 246-249.

¹⁶³ Rücker, G., Manns, D., Wilbert, S., (1992). Homoditerpene Peroxides from *Artemisia absinthium* Phytochemistry. 31: 340-342.

¹⁶⁴ Chialva, F., Liddle, P.A.P., Doglia, Giovanni. (1983). Chemotaxonomy of Wormwood (*Artemisia absinthium* L.). Z. Lebensm. Unter. For. 176: 363-366.

¹⁶⁵ Ariño, A., Arberas, I., Renobales, G., Arriaga, S., Domínguez, J.B. (1999). Essential Oil of *Artemisia absinthium* L. from the Spanish Pyrenees. J. Essent. Oil Res. 11: 182-184.

Lactonas sesquiterpénicas

Forman un grupo muy numeroso de compuestos, con más de 1400 estructuras diferentes. Las lactonas sesquiterpénicas son muy características de la familia de las Asteráceas, donde se encuentran cerca del 90% de las estructuras conocidas.¹⁸⁴ Fuera de esta familia también se han aislado en algunos géneros de Apiáceas, Magnoliáceas y Lauráceas, e incluso en hongos.¹⁸⁵

¹⁶⁶Bertelli D.J., Crabtree, J.H. (1968). Naturally Occurring Fulvene Hydrocarbons. *Tetrahedron*. 24: 2079-2089.

¹⁶⁷ Geissman, T.A., Winters, T.E. (1968). The structure of artabsin. *Tetrahedron Lett.* 27: 3145-3147.

¹⁶⁸ Vokáč, K., Samek, Z., Herout, V., Šorm, F. (1968). The Structure of Artabsin and Absinthin. *Tetrahedron Lett.* 35: 3855-3857.

¹⁶⁹ Beauhaire, J., Fourrey, J.L., Vuilhorgne, M. (1980). Dimeric Sesquiterpene Lactones: Structure of Absinthin. *Tetrahedron Lett.* 21: 3191-3194.

¹⁷⁰ Beauhaire, J., Fourrey, J.L., Lallemand, J. Y., Vuilhorgne, M. (1981). Dimeric sesquiterpene lactone. Structure of isoabsinthin acid isomerisation of absinthin derivatives. *Tetrahedron Lett.* 22: 2269-2272.

¹⁷¹ Beauhaire, J., Fourrey, J.L., Gutter E. (1984). Structure of Absintholide a New Guaianolide Dimer of *Artemisia absinthium* L. *Tetrahedron Lett.* 25: 2751-2754.

¹⁷² Kasymov, S.Z., Abdullaev, G.P., Sidiyakin, G.P., Yagudaev, M.R. (1979). Anabsin-a new Diguaianolide from *Artemisia absinthium*. *Khim. Prir. Soedin.*, 495.

¹⁷³ Schneider, G., Milke, B. (1979) Analysis of the Bitter Principles Absinthin, Artabsin and Matricin from *Artemisia absinthium* L. Part. II: Isolation and determination. *Deutsche Apotheker Zeit.* 119: 977-982.

¹⁷⁴ Herout, V., Novota, L., Sorm, F. (1956). Plant Substances. V. Isolation of further crystalline compounds from wormwood. *Chemicke Listy pro Vedu a Prumysl.* 50: 591-597.

¹⁷⁵ Akhmedov. I.S., Kasymov, S.Z., Sidiyakin, G.P. (1979). Artabin, a New Lactone from *Artemisia absinthium*. *Khim. Prir. Soedin.* 6: 622-623.

¹⁷⁶ Zakirov, S.K., Kasymov, S.Z., Sidiyakin, G.P. (1976). Structure of ashurbin and arabsin. *Khim. Prir. Soedin.* 4: 548-549.

¹⁷⁷ Safarova, A.G., Serkerov, S.V. (1997). Sesquiterpenes Lactones of *Artemisia absinthium*. *Chemistry of Natural Compounds*. 33, 6.

¹⁷⁸ Akhmedov. I.S., Kasymov, S.Z., Sidiyakin, G.P. (1979). Artemoline, a New Lactone from *Artemisia absinthium*. *Khim. Prir. Soedin.* 5: 658-661.

¹⁷⁹ Akhmedov. I.S., Kasymov, S.Z., Sidiyakin, G.P. (1972). Arabsin, a New Lactone from *Artemisia absinthium*. *Khim. Prir. Soedin.* 2: 245-246.

¹⁸⁰ Beauhaire, J., Fourrey, J.L. (1982). Structures of the Artabsinolides: Photo-oxygenation studies on artabsin. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* 1: 861-864.

¹⁸¹ Kasymov, S.Z., Abdullaev, N.D., Yusupov, M.I., Sidiyakin, G.P., Yagudaev, M.R. (1984). New guaianolides from *Artemisia absinthium*. *Khim. Prir. Soedin* 6: 794-795.

¹⁸² Ovezdurdyev, A., Zakirov, S. K., Yusupov, M., Kasymov, S.Z., Abdusamatov, A., Malikov, V.M. (1987). Sesquiterpene lactones of two *Artemisia* species. *Khim. Prir. Soedin.* 4: 607-608.

¹⁸³ Herout, V., Sorm, F., (1956). Terpenes.LXX.Monocyclic lactones from wormwood. *Chemicke Listy pro Vedu a Prumysl.* 50: 586-590.

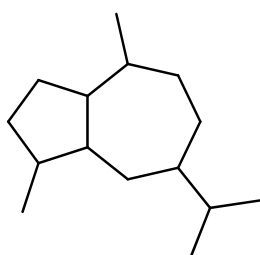
¹⁸⁴ Seaman, F.C. (1982). Sesquiterpene Lactones as Taxonomic Characters in the Asteraceae. *Bot. Rev.* 48: 123-595.

¹⁸⁵ Hegnauer R. (1992). *Chemotaxonomie der Pflanzen*, vol. X. Birkhäuser Verlag Basel, Germany.

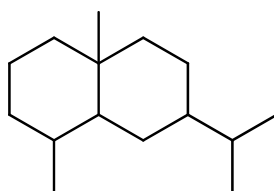
A nivel genérico, las lactonas sesquiterpénicas han podido correlacionarse en algunos casos con patrones de distribución geográfica¹⁸⁴ o con aspectos evolutivos de la biología floral en *Artemisia*,¹⁸⁶ pudiendo observarse la existencia de una cierta variabilidad química entre poblaciones diferentes.

Además de su utilidad quimiotaxonómica, muchas lactonas sesquiterpénicas tienen actividad biológica que las hacen interesantes para otros fines.

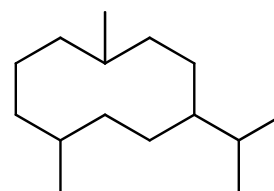
Las principales lactonas sesquiterpénicas aisladas de *Artemisia* tienen la estructura básica de guaiano, eudesmano y germacrano.



Guaiano



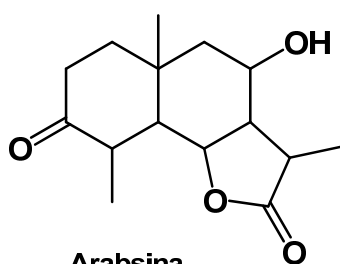
Eudesmano



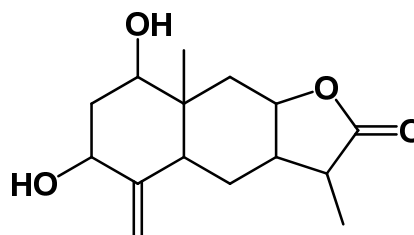
Germacrano

Las más importantes son las de estructura guaianolida, sobre todo la absintina, que es la principal responsable del carácter amargo de esta planta. Este compuesto y su isómero isoabsintina tienen estructura de lactona sesquiterpénica dimérica, y ambas en medio ácido se transforman en anbsintina e isoanabsintina respectivamente. Se han propuesto diversas estructuras para estos compuestos, aunque hasta los años 80 no se han confirmado con estudios de resonancia magnética nuclear.¹⁷⁰

Eudesmanólidos aislados de *A. absinthium*

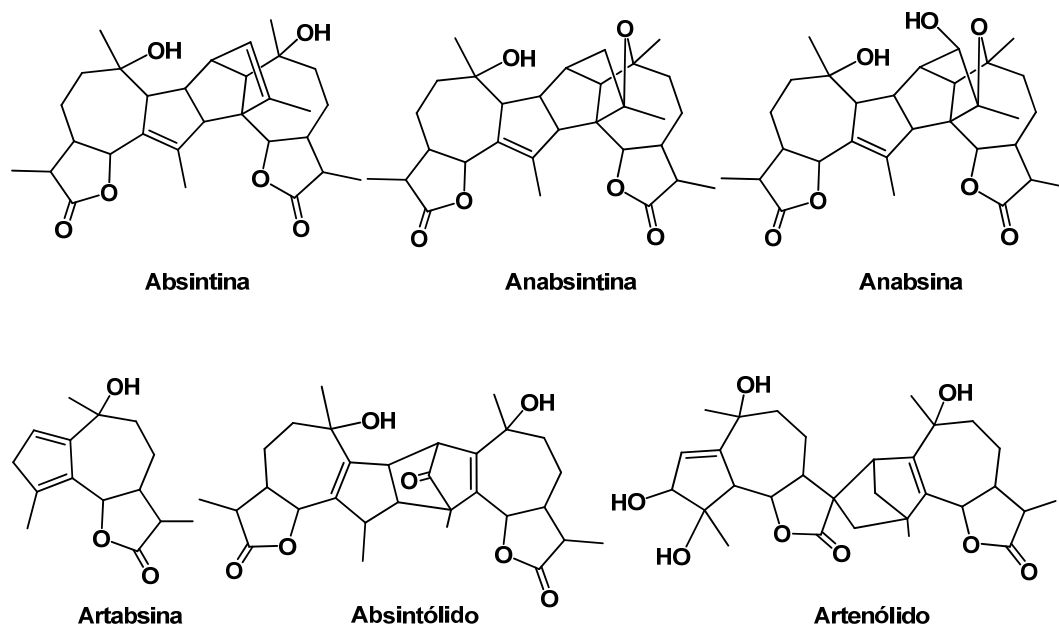


Arabsina



Asurbina

¹⁸⁶ Greger, H. (1977). Anthemidae-Chemical Review. The Biology and Chemistry of the Compositae.

Guaianólidos aislados de *A. absinthium*

Las lactonas sesquiterpénicas con estructura de guaianólido pueden ser precursoras del compuesto azul camazuleno, responsable del color azul del aceite esencial, así como de los denominados camazulenógenos.¹⁸⁷ Ya en 1955 se citó la absintina como un proazuleno natural, que por hidrólisis alcalina generaba camazuleno.¹⁸⁸ Posteriormente, se demostró que por calentamiento, la estructura dimérica absintina se convertía en el monómero artabsina, que al calentarse en medio básico da lugar a un dianión precursor del camazuleno.^{166,187} Otro compuesto precursor del camazuleno es la matricina, encontrada en *Artemisia arborescens* y aislada por primera vez de *Matricaria chamomilla*.¹⁸⁹

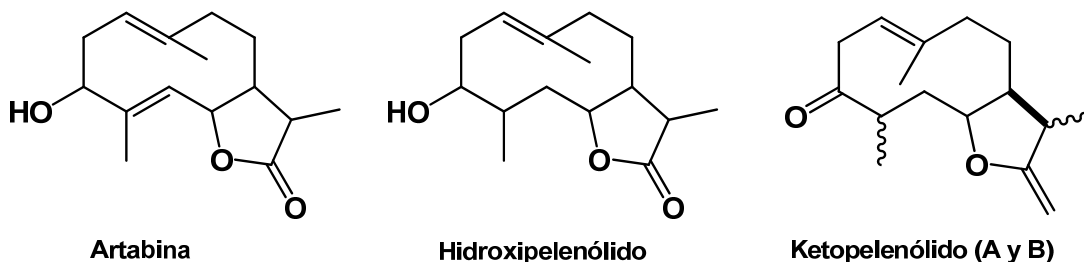
V.H.Heywood, J.B. Harborne y B.L. Turner, eds., Vol II. Academic Press, London.

¹⁸⁷ Vokác, K., Samek, Z., Herout, V., Sorm, F. (1969). The structure of Artabsin and the Origin and Structure of the Coloured Hidrocarbon Chamazulenogen from Wormwood Oil. Collect. Czech. Chem. C. 34: 2288-2293.

¹⁸⁸ Sorm, F., Novotny, L., Herout, V. (1955). A Further Chamazulene Precursor: The Bitter Principle of *Artemisia absinthium* L. Chem. Ind.-London. 5: 569.

¹⁸⁹ Teisseire, P. (1987). Industrial Quality Control of Essentials Oils by Capillary Chromatography. Capillary Gas Chromatography in Essential Oil Analysis (P.Sandra y C.Bicchi, eds.), Alfred Huething Verlag, Heidelberg.

Germacranólidos aislados de *A. absinthium*



Composición química del aceite esencial

Las plantas aromáticas tienen estructuras celulares específicas donde se sintetiza y acumula el aceite esencial, entendiéndose como tal al conjunto de sustancias volátiles que pueden extraerse de una planta por destilación.¹⁹⁰ El aceite esencial suele consistir en una mezcla, más o menos compleja, de compuestos terpénicos, compuestos fenólicos de bajo peso molecular y compuestos que contienen nitrógeno o azufre. Todos estos compuestos están muy ampliamente distribuidos entre las plantas vasculares y se sintetizan durante el desarrollo normal de la planta, siendo la composición química del aceite generalmente característica de cada especie.¹⁹¹

El interés del aceite esencial radica en la actividad de sus componentes, ya sea por su carácter aromático, por su toxicidad, como por su funcionalidad fisiológica.

Los componentes mayoritarios del aceite esencial de las especies de *Artemisia* son fundamentalmente terpénicos, pertenecientes a diversos tipos estructurales, monoterpenos (hidrocarburos, alcoholes, cetonas, ésteres, aldehídos, óxidos) y sesquiterpenos (hidrocarburos, óxidos y alcoholes).¹⁹² El rendimiento del aceite esencial se encuentra entre el 0.2-0.6% sobre el peso fresco del material vegetal,¹⁹³ siendo la β -

¹⁹⁰ Brueton, J. (1995). Pharmacognosie. Phytochemistry. Medicinal Plants. Technique et Documentation, Lavoisier, Paris.

¹⁹¹ Reineccius, G (Ed.) (1994) Source Book of Flavours. Chapman & Hall, New York.

¹⁹² Mucciarelli, M., Caramiello, R., Maffei, M. (1995). Essential Oils from Some *Artemisia* Species Growing Spontaneously in North-West Italy. Flavour Frag. J. 10: 25-32.

¹⁹³ Bruneton, J. (1993). Pharmacognosie. Phytochemistry. Medicinal Plants. Technique et Documentation. Lavoisier, Paris.

tuyona, uno de los compuestos con más relevancia, que puede aparecer en concentraciones superiores al 30 %.^{194,195}

A pesar de que tradicionalmente se había descrito la β -tuyona como compuesto mayoritario del aceite esencial de ajeno, han sido muchos autores los que a lo largo de los años han descrito plantas con bajo contenido en tuyonas o incluso sin ellas,^{150,196} describiéndose diferentes quimiotipos que contienen como compuesto mayoritario acetato de cis-crisantenilo, cis-crisantenol, cis-epoxiocimeno, acetato de sabinilo o acetato de bornilo.^{163,164,197}

Otros compuestos terpénicos abundantes descritos en el aceite esencial son alcanfor y 1,8 cineol, siendo también frecuentes aunque en cantidades menores otros mono y sesquiterpenos como linalol, borneol, camazuleno, selineno, elemol, espatulenol^{164,192}

La concentración de sesquiterpenos identificados en *A. absinthium* no suele superar el 10% del aceite esencial, siendo los más frecuentes el β -cariofileno, el germacreno D, el óxido de cariofileno y el α -bisabolol.^{164,165}

Otra familia de compuestos identificados en el aceite esencial de numerosas especies son los bencenoides derivados del ácido cinámico en la ruta del siquimato.¹⁹⁰

Así mismo, en varias especies del género *Artemisia* se han identificado pequeñas concentraciones de algunos compuestos de esta familia como eugenol, metil eugenol, elemicina y cinamato de etilo y metilo.^{198,199,200}

¹⁹⁴ Masada, Y. (1976). Wormwood Oil. Analysis of Essential Oils by Gas Chromatography and Mass Spectrometry. John Wiley & Sons, Inc., London.

¹⁹⁵ Kennedy, A.I., Deans, S.G., Svoboda, K.P., Gray, A.I., Waterman, P.G. (1993). Volatile Oils from Normal and Transformed Roots of *Artemisia absinthium*. Phytochemistry.32: 1449-1451.

¹⁹⁶ Nin, S., Arfaio, P., Boceto, M. (1995). Quantitative Determination of Some Essential Oil Components of Selected *Artemisia absinthium* Plant. J. Essent. Oil Res. 7: 271-277.

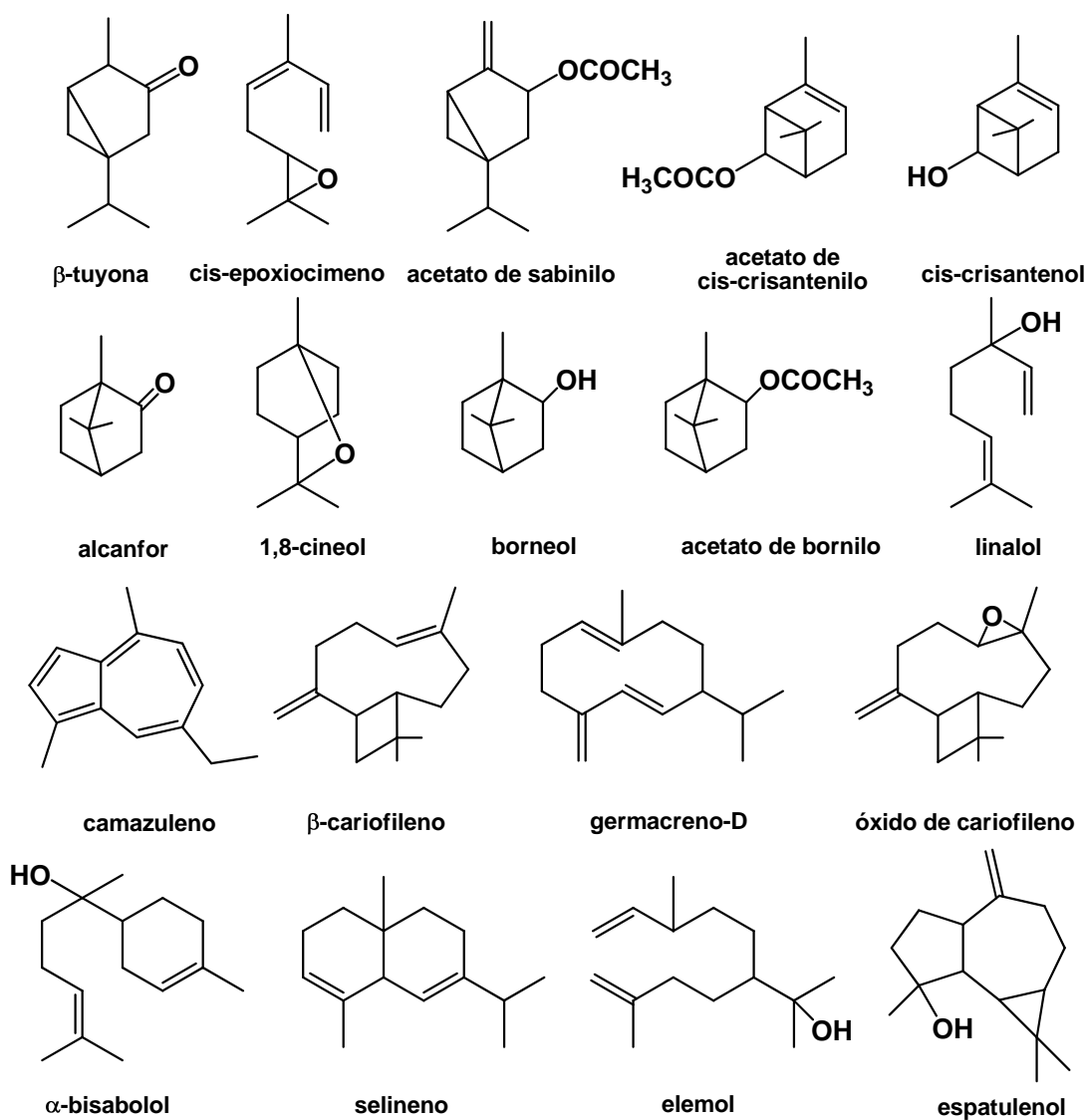
¹⁹⁷ Carnat, A.P., Madesclaire, M., Chavignon, O., Lamaison, J.I. (1992). Cis- Chrysanthenol, a main component in essential oil of *Artemisia absinthium* L. growing in Auvergne (Massif Central), France. J. Essent. Oil Res., 4: 487-490.

¹⁹⁸ Pino, J.A., Rosado, A., Fuentes, V. (1997). Chemical Composition of the Essential Oil of *Artemisia absinthium* L. from Cuba. J. Essent. Oil Res. 9: 87-89.

¹⁹⁹ Blagojevic, P., Radulovic, N., Radosav, P., Stojanovic, G. (2006). Chemical Composition of the Essential Oil of Serbian Wild-Growing *Artemisia absinthium* and *Artemisia vulgaris*. J. Agric. Food Chem. 54: 4780-4789.

Los compuestos pertenecientes a las familias de los terpenos y de los bencenoides son los más frecuentes en el aceite esencial del ajeno y son los responsables de su aroma.

Estructura de los principales compuestos terpénicos descritos en el aceite esencial de *A. absinthium*.



²⁰⁰ Basta, A., Tzakou, O., Couladis, M. (2007). Chemical Composition of *Artemisia absinthium* L. from Greece. J. Essent. Oil Res. 19: 316-318.

Existe una alta variabilidad en la composición del aceite esencial de *A. absinthium*, que depende de muchos factores como las condiciones de crecimiento, el estado de desarrollo, el momento de la recolección así como la presencia de flores, frutos o raíces.²⁰¹ Esta variabilidad intraespecífica detectada en la composición de los aceites es bastante superior a la que presentan otros metabolitos secundarios,²⁰² por lo que se han utilizado para definir quimiotipos o razas químicas, que algunas veces pueden relacionarse con factores ecológicos o geográficos.

Actividad biológica

Conocida desde muy antiguo ya por los egipcios, transmitida después a los griegos, esta hierba ha sido denominada la "*madre de todas las hierbas*" en la obra "Tesoro de los pobres"²⁰³ dadas sus múltiples aplicaciones curativas como tónico, febrífugo y antihelmíntico.

Además de por sus virtudes medicinales, el ajeno ha sido utilizado como aromatizante desde la antigüedad, como demuestran el vino conocido como "absinthies", enriquecido con extracto de ajeno que aparece en la Historia Natural de Plinio.²⁰⁴ Hoy en día, el principio activo absintina (sustancia amarga) se utiliza en la preparación de bebidas comerciales como el vermouth.

El aceite esencial de ajeno y el alcohol constituyen los ingredientes básicos de la absenta, bebida que fue prohibida a principios del siglo XX por su toxicidad. Los efectos neurotóxicos y alucinógenos, así como su nefrotoxicidad son atribuidos a la tuyona, una monoterpenocetona presente en el aceite esencial.²⁰⁵

²⁰¹ Müller-Ribeau, F.J., Berger, B.M, Yegen, O., Cakir, C. (1997). Seasonal variations in the chemical composition of essential oils of selected aromatic plants growing wild in Turkey. J. Agric. Food Chem. 45: 4821-4825.

²⁰² Kokkini, S. (1991). Chemical Races within the Genus *Mentha* L. Essential Oils and Waxes (H.F. Likens y J.F.Jackson, eds.), Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg.

²⁰³ Julian, Maestro Pedro, *Tesoro de pobres*, 1644.

²⁰⁴ Arnold, W.N. (1989). Absenta. Investigación y Ciencia, 8: 82-88.

²⁰⁵ Hose, S. (2002). Wormwood, *Artemisia absinthium* L. Zeitschrift Phytother. 23: 187-194.

El ajeno ha sido empleado desde tiempos remotos para el tratamiento de trastornos digestivos¹⁹⁶ ya que estimula el apetito,²⁰⁶ previene la formación de gases en el tubo digestivo,²⁰⁷ estimula la secreción de jugos gástricos y de bilis tanto por la vesícula biliar como por el hígado²⁰⁸ y protege frente a dolencias hepáticas.²⁰⁹

A. absinthium presenta propiedades antipiréticas,²¹⁰ antioxidantes²¹¹ y antiinflamatorias.^{113,212} También se ha utilizado como antídoto para el opio y otros venenos depresores del sistema nervioso central.²¹³

La actividad antibacteriana y fungicida del aceite esencial de *A. absinthium* ha sido descrita por numerosos autores.^{196,214,215} La tuyona,²¹⁶ el alcanfor y el 1,8 cineol, que son componentes mayoritarios del aceite, han demostrado tener actividades antifúngicas y antibacterianas,²¹⁷ así como otros monoterpenos presentes en el aceite como borneol, α y β pineno, terpinenol, linanol.^{218, 219,220}

²⁰⁶ Arteche, A., Fernández, J.A., Güenechea, J.I., Vanaclotxa, B (1992). Fitoterapia “La Terapéutica con Plantas Medicinales”, CITA, Publicaciones y Documentación, Bilbao.

²⁰⁷ Wichtl, M. (1994). Absinthii herba. Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals. (Norman Grainger Bisset, ed.), London.

²⁰⁸ Peris, J.B., Stübing, G., Vanaclotxa, B. (1995). Ajenjo. Fitoterapia Aplicada (M.I.C.O.F., ed.), Valencia.

²⁰⁹ Gilani, A.U.H., Janbaz, K.H. (1995). The structure of Artabasin. Tetrahedron Lett. 27: 3145-3147.

²¹⁰ Ikram, M., Shafi, N., Mir, I., Do, M.N., Nguyen, P., Le Quesne, P.W. (1987). 24 ζ -Ethylcholesta-7,22-Dien-3 β -ol: A Possibly Antipyretic Constituent of *Artemisia absinthium*. Planta Med. 53: 389.

²¹¹ Canadanovic-Brunet, J.M., Dijilas, S.M., Cetkovic, G.S., Tumbas, V.T. (2005). Free-radical scavenging activity of wormwood (*Artemisia absinthium* L.) extracts. J. Sci. Food Agric. 85: 265-272.

²¹² Sommer, L., Pislarasu, N., Popescu, S., Burlibas, C. (1965). Effect of Chamzulene Extracted from Absinthin on the Inflammation of the Periontium and of Postoperative Complications. Farmacia, 13: 471-474.

²¹³ Albert- Puleo, M. (1978). Mythobotany, Pharmacology and Chemistry of Thujone-Containing Plants and Derivatives. Economic Botany. 32: 65-74.

²¹⁴ Bourrel, C., Villarem, G., Michel, G., Gaset, A. (1995). Study of the bacteriostatic and fungistatic properties in solid media of 24 previously analyzed essential oils. Riv. Ital. EPPOS, 6: 3-12.

²¹⁵ Kordali, S., Kotan, R., Mavi, A., Fakir, A., Ala, A., Yildirim, A. (2005). Determination of the Chemical Composition and Antioxidant Activity of the Essential Oil of *Artemisia dracunculus* and of the Antifungal and Antibacterial Activities of Turkish *Artemisia absinthium*, *A. dracunculus*, *Artemisia santonicum*, and *Artemisia spicigera*. Essential Oils. J. Agric. Food Chem. 53: 9452-9458.

²¹⁶ Juteau, F., Jerkovic, I., Masotti V., Milos, M., Mastelic, J., Bessiere, J.M., Viano, J. (2003). Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil of *Artemisia absinthium* from Croatia and France. Planta Med. 69: 158-161.

²¹⁷ Abad, M.J., Ansuategui, M., Bermejo, P. (2007) Active Antifungal Substances from Natural Sources. Arkivoc. 7: 116-145.

²¹⁸ Neszmélyi, A., Milne, G.W.A., Podányi, B., Koezka, I., Héthelvi, E. (1992). Composition of the essential Oil of Clone 409 of *Tanacetum vulgare* and 2D NMR Investigation of Trans-Chrysanthenyl Acetate. J. Essent. Oil Res. 4: 243-250.

Desde la antigüedad el ajeno se ha utilizado contra parásitos intestinales, de donde deriva su nombre en inglés “wormwood”.²⁰⁴ El extracto de las hojas de *A. absinthium* presenta actividad antimalárica,^{221,222} así como dos homoditerpeno peróxidos que se han aislado de esta planta.²¹²

El aceite esencial tiene actividad acaricida frente a la araña roja²²³ e insecticida frente a gorgojos²²⁴ y mosca común.²²⁵ Además se ha utilizado como repelente de pulgas, moscas,²²⁶ mosquitos,²²⁷ polillas²⁰⁴ y garrapatas.²²⁸ Por otro lado, el extracto también ha resultado tener efectos tóxicos y antialimentarios frente al escarabajo de la patata (*L. decemlineata*).²²⁹

Cabe destacar el papel ecológico que juega el aceite esencial en las relaciones bióticas con animales y plantas (herbivorismo, polinización, alelopatía).²¹⁹ El 1,8-cineol y el alcanfor, que son compuestos mayoritarios del aceite, están considerados, entre los monoterpenos, como las toxinas más efectivas capaces de inhibir el crecimiento de plantas y la germinación de semillas.²³⁰

²¹⁹ Yashphe, J., Feuerstein, I., Barel, S., Segal, R. (1987). The Antibacterial and Antispasmodic Activity of *Artemisia herba alba* Asso. Int. J. Crude Drug Res. 25: 89-96.

²²⁰ Lamarti, A., Sadki, I., Badoc, A., Deffieux, G., Carde, J.P. (1996). Obtention par Culture in vitro de Clones d'absinthe, *Artemisia absinthium* L., dénués de Thuyone. Bulletin Société de Pharmacie de Bourdeaux, 135: 25-43.

²²¹ Zafar, N.M., Hamdard, M.E., Hameed, A. (1990). Screening of *Artemisia absinthium* for antimalarial effects on *Plasmodium berghei* in mice: a preliminary report. J. Ethnopharmacol. 30: 223-226.

²²² Rodríguez-Pérez, M., Marínez, J.M., Rivero, L.R., Álvarez, H.M.H., Valdez, A.F.C., Rodríguez, D.A., Lizama, R.S., Payrol, J.A. (2006). Evaluación de la actividad antimalárica de algunas plantas utilizadas en la medicina cubana. Rev. Cienc. Farm. Básica Apl. 27: 197-205.

²²³ Chiasson, H., Bélanger, A., Bostanian, N., Vincent, C., Poliquin, A. (2001). Acaricidal Properties of *Artemisia absinthium* and *Tanacetum vulgare* (Asteraceae) Essential Oils Obtained by three Methods of Extraction. J. Econ. Entomol. 94: 167-171..

²²⁴ Kordali, S., Aslan, I., Calsamur, O., Calir, A. (2006). Toxicity of essential oils isolated from three *Artemisia* species and some of their major components to granary weevil, *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). Ind. Crop Prod. 23: 162-170

²²⁵ Kaul, V.K., Nigam, S.S., Banerjee, A.K. (1978). Insecticidal activity of some essential oils. Indian J. Pharm. 40: 22.

²²⁶ Erichsen-Brown. C. (1979). Use of plants for the past 500 years. Breezy Creeks Press. Aurora, Ontario, Canada.

²²⁷ Morton, J.F. (1981). Atlas of medicinal plants of middle America. Charles C. Thomas, Springfield, IL.

²²⁸ Jaenson, T.G.T., Palsson, K., Borg-Karlson, A.K. (2005). Evaluation of extracts and oils of tick-repellent plants from Sweden. Med. Vet. Entomol. 19: 345-352.

²²⁹ Ertürk, Ó., Uslu, U. (2007). Antifeedant, growth and toxic effects of some plant extracts on *Leptinotarsa decemlineata* (Say.) (Coleoptera, Chrysomelidae). Fresen. Environ. Bull. 16: 601-607.

²³⁰ Harborne, J.B. (1993). Introduction to Ecological Biochemistry. Academic Press, London.

3. Objetivos

Objetivo general:

Búsqueda de nuevos principios activos para el control de parásitos y sus vectores, así como otras plagas de interés agrícola.

Objetivos específicos:

- Selección de especies vegetales con propiedades insecticidas y antiparasitarias
- Estudio fitoquímico de las especies seleccionadas: aislamiento de productos activos y elucidación estructural de los mismos.
- Estudio de la actividad biológica de los productos aislados.
- Elaboración de un método de producción sostenible de agentes activos.

En el presente estudio se pretende proseguir la búsqueda de nuevos principios activos para lo cual se han realizado estudios de actividad biológica con los extractos, aceites y compuestos aislados de las especies vegetales descritas anteriormente, *P. indica* y *A. absinthium*, sobre diferentes organismos diana. Entre ellos se encuentran los parásitos *T. cruzi* y *L. infantum*, por su importancia como agentes causantes de parasitosis de relevancia mundial, vectores responsables de la transmisión de las parasitosis como es el caso del redúvido *R. prolixus*, insectos y hongos responsables de plagas agrícolas (*S. littoralis*, *R. padi*, *M. persicae* y hongos fitopatógenos del género *Fusarium*), cultivos de líneas celulares de insecto y de mamífero (Sf9 y CHO) para conocer la citotoxicidad de los compuestos, así como semillas de lechuga, trigo y cebada, para evaluar la posible fitotoxicidad de nuestros compuestos en el medio ambiente.

Material y métodos

Material y métodos

1. Técnicas generales

1.1. Técnicas instrumentales

- Puntos de fusión

Se determinaron en un aparato tipo Kofler de la firma Reichert-Thermovar (sin corregir).

- Rotación óptica

La determinación de las actividades ópticas se realizó en un polarímetro Perkin Elmer modelo 343 usando la línea D de una lámpara de sodio.

Los productos se disolvieron en CHCl_3 y la medida se realizó en una célula de 1 ml de volumen y 1 dm de longitud (l). La concentración se expresa g/100 ml (c) de disolución.

$$[\alpha]_d = \alpha \times 100 / l \times c$$

- Espectros de I.R.

Los espectros de infrarrojo se realizaron en disolución en CHCl_3 , utilizando una pastilla de NaCl de 1 cm de diámetro, en un espectrofotómetro de la firma Bruker, modelo IFS 66/S.

- Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C se realizaron en espectrómetros Bruker Advance y AMX-500 a 400 y 500 MHz para el ^1H y a 100 y 125 para el ^{13}C .

Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en partes por millón y las constantes de acoplamiento (J) en Hertzios (Hz).

Como patrón interno de referencia se empleó el tetrametilsilano (TMS) y como disolvente se usó el deuterocloroformo (CDCl_3), mientras no se indique lo contrario.

Los experimentos de 2D con correlación homo y heteronuclear COSY, HSQC, HMBC y NOESY, fueron realizados con programa de la firma Bruker.

- **Espectros de masas (EM)**

Los espectros de masas de alta y de baja resolución se realizaron en un espectrómetro Micromass, modelo Autospec.

La técnica empleada fue impacto electrónico (IE) con un potencial de ionización de 70 eV y la fuente se mantuvo a una temperatura de 230° C.

Las muestras se introdujeron directamente mediante una sonda de sólidos. Para cada compuesto se ha indicado solamente los picos más significativos estructuralmente y/o de mayor intensidad relativa.

- **Espectofotometría**

Para medir tanto la viabilidad de las líneas celulares como la de los parásitos se utilizó un espectofotómetro SLT 340 ATTC (Microtiter Plate Spectrophotometer). En el caso de los parásitos la longitud de onda utilizada es de 570 nm, mientras que para las células la lectura se realiza a dos longitudes de onda, 570 y 620 nm (absorbancia de referencia), obteniéndose los datos de la diferencia de absorbancias a ambas longitudes de onda (570-620).

1.2. Técnicas cromatográficas

- **Cromatografía en capa fina (CCF)**

Se utilizaron placas de gel de sílice de 0.20 mm de espesor de la casa Macherey-Nagel y Merck. Las placas se revelaron por pulverización con una solución de ácido sulfúrico (4%) y ácido acético (80%) en agua destilada, y a continuación se calentaron a una temperatura de 120 °C.

- **Cromatografía líquida de vacío (VLC)**

Para este tipo de cromatografía se utilizó gel de sílice de grano fino (0.015-0.040 mm, Merck). Las dimensiones de las distintas columnas de vidrio utilizadas dependieron del peso del extracto y/o fracción de partida, según lo recomendado por Coll y Bowden (1986).¹ La muestra se coloca en forma de “cabeza de columna”, absorbida en gel de

¹ Coll, C.J., Borden, F.D. (1986). J.Nat.Prod. 49: 934.

sílice más gruesa de 0.063-0.200 mm de diámetro. La elución se realiza en gradientes de polaridad creciente y los disolventes empleados fueron mezclas de n-hexano (n-Hex), acetato de etilo (AcOEt) y/o metanol (MeOH).

- **Cromatografía en columna (CC)**

Las columnas cromatográficas de gel de sílice “secas” se prepararon de la siguiente forma: se hace vacío en la parte inferior de la columna y al mismo tiempo por el extremo superior se introduce lentamente la gel de sílice de grano fino (0.2-0.05 mm) o de grano más fino (0.040-0.015 mm). Las mezclas a separar se colocaron como “cabeza” mezclando la muestra con gel de sílice. Seguidamente fueron eluidas con mezclas de polaridad creciente empleando n-Hex/AcOEt/MeOH. Los componentes de las diferentes fracciones fueron detectadas por la técnica de CCF.

- **Cromatografía de exclusión molecular (SPH)**

Para este tipo de cromatografía se usó como soporte Sephadex LH-20 (Pharmacia Fine Chemicals) para la fase estacionaria y las columnas se montaron en metanol. Para la fase móvil se emplearon sistemas n-Hex: CHCl₂: MeOH en distintas proporciones.

- **Cromatografía líquida de alta presión (HPLC)**

Las cromatografías líquidas de alta presión se realizaron en un equipo Beckman Coulter 125P, acoplado a un detector de fotodiodo modelo 168, controlado por el programa 32-Karat. Las muestras se filtraron previamente con filtros de 0,45 µm de tamaño de poro y los disolventes empleados fueron de grado HPLC. Las separaciones se llevaron a cabo sobre columnas de fase normal, de Interstil sílica de 20 mm x 250 mm (preparativa) de 10 µ de tamaño de partícula y Ultrasphere sílica de 10 mm x 250 mm (semipreparativa) de 5 µ de tamaño de partícula, dependiendo de la cantidad de muestra. Se utilizaron también columnas de fase reversa preparativas, de Interstil ODS de 20 mm x 250 mm y 10 µ de tamaño de partícula.

Los estudios cuantitativos de los extractos de parte aérea y raíces de *A. absinthium* fueron llevados a cabo con un HPLC Agilent modelo 1100, con detector diodo array y una columna Zorbax Eclipse XDB-C18 de 15 x 4.6 cm (5 μ).

- **Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (LC-MS)**

En cuanto a los estudios de cuantificación, se utilizó un cromatógrafo líquido con bomba de gradiente cuaternario Finnigan Surveyor Scientific, con una columna Hypersil HyPurity C18 (100 x 2.1 mm, tamaño de partícula: 3 μ m) acoplado a un espectrómetro de masas de trampa iónica (Finnigan LCQ Deca ion trap), con una interfaz ESI. Todos los instrumentos provienen de Thermo Fisher Scientific (San José, CA, USA).

- **Cromatografía de gases- masa (GC-MS)**

Los estudios cualitativos y cuantitativos de compuestos volátiles se han realizado con un cromatógrafo de gases Agilent modelo 5973N acoplado a un detector de masas con fuente de ionización por impacto electrónico (IE) a 70eV. Con este equipo se ha utilizado una columna capilar HP-1 (fase ligada de metil silicona) de Hewlett-Packard: 25 m de largo, 200 μ m de diámetro interno y 0.2 μ m de espesor de fase. Las condiciones utilizadas han sido: split (30:1), temperatura del inyector 260°C, temperatura de la columna 70°C, calentando hasta 270°C a 4°C/min. Los espectros de masas y el tiempo de retención han sido utilizados para identificar los compuestos por comparación con los encontrados en la base de datos Wiley (Wiley 275 Mass Spectra Database, 2001) mientras que para la cuantificación se han utilizado los % del área de los picos obtenidos en los cromatogramas.

1.3. Técnicas de extracción

- **Extracción con CO₂ supercrítico**

Los experimentos se llevaron a cabo en una planta piloto construida por el grupo GATHERS (Facultad de Ciencias, Universidad de Zaragoza) y consta de una

bomba de compresión (Milton Roy) con un filtro HiP, un cilindro de extracción de 1 l (HiP), dos colectores de 180 ml (Hoke), una sistema de refrigeración cilíndrica (Hoke), un intercambiador de calor (Haake), un sensor de presión (Tescom Corporation) y un medidor de flujo (Aalborg).

El procedimiento de extracción es similar al descrito por Reverchon.² Las plantas se introdujeron en el cilindro de extracción y fueron embebidas simétricamente con materiales porosos inertes que permiten un flujo homogéneo de CO₂. Una vez que se alcanza una temperatura de 40° C, la bomba comprime el CO₂ hasta conseguir una presión de 90 bar. Cuando el fluido supercrítico a la presión de trabajo llena el extractor comienza el proceso de extracción.



Planta piloto de extracción de fluidos supercríticos (GATHERS, Universidad de Zaragoza).

El tamaño de partícula utilizado (valor medio) es de 0.5 mm, y el flujo de gas a través del extractor (o de la muestra: hojas y flores trituradas al tamaño medio de partícula indicado) de 10.5 l/min (a 25° C y 1 atm).

La extracción con CO₂ supercrítico en un sistema dinámico provisto de un recipiente de extracción y dos colectores, el primero de ellos para eliminar compuestos pesados (ceras) y el segundo para la recogida del aceite esencial. La presión en los colectores se controla manipulando diferentes válvulas y las bajas temperaturas se consiguen gracias a la acción del sistema de refrigeración. El extracto del segundo

² Reverchon, E., De Marco, I. (2006). Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. J. Supercrit. Fluid. 38: 146.

separador es recogido y pesado a diferentes intervalos de tiempo para obtener la curva de extracción.

- Hidrodestilación

La obtención del aceite esencial de las distintas poblaciones de ajeno se llevó a cabo por hidrodestilación en laboratorio, por el método trampa tipo Clevenger, acogido a Farmacopea Europea, en la Finca Experimental “La Alfranca”, del Gobierno de Aragón bajo la dirección del Ing. Jesús Burillo.



Colector de destilación según la Farmacopea Europea. Destilador Clevenger.

2. Material biológico

2.1. Material vegetal

2.1.1. *Persea indica* (L.) Sprengel

Clasificación:³

Phylum: Trachophyta, Sinnott, 1935.

Clase: Magnoliopsida, Brongniart, 1843.

Orden: Laurales, Perleb, 1826.

Familia: Laureaceae, Durande, 1982.

Género: *Persea*, Miller, 1754.

Subgénero: Eriodaphne.

Especie: *Persea indica*.



Persea indica, parte aérea y raíces

Plántulas procedentes del Parque Nacional de Garajonay (donación de A. Fernández, Director) se multiplicaron por esqueje en perlita-vermiculita con IAA y se transfirieron a un tanque de cultivo aeropónico diseñado en el laboratorio y localizado



Cámara de cultivo aeropónico

en invernadero con calefacción. Las plantas se mantuvieron mediante pulverización continua de las raíces (cada 12 s) con una solución nutritiva 0.2 g/l de Nutrichem (20:20:20 de N, P, K- Miller Chemical & Fertilizer Corp) y 0.03% H_2O_2 (33% w/v Panreac) y suplemento de luz (16:8, L:O) durante un período de nueve meses durante los cuales se recolectaron las raíces periódicamente cuando la longitud alcanzaba los 20-30 cm.

La cámara aeropónica tiene unas dimensiones 1.52 m x 1.80 m x 82 m y un volumen de agua de 90 l. La separación entre las plantas es de 20 cm y se encuentran sujetas con un soporte inerte de poliestireno.

2.1.2. *Artemisia absinthium* L.

La clasificación sistemática es la siguiente:³

Orden: Asterales, Lindley, 1833

Familia: Asteráceas, Dumortier, 1822

Subfamilia: Asteroideas

Tribu: Anthemidae

Género: *Artemisia*, Linnaeus, 1753

Especie: *Artemisia absinthium* L.



Para la puesta en cultivo del ajeno es necesario disponer de material vegetal seleccionado no solamente por su adaptabilidad al cultivo, sino por su composición química. Su multiplicación puede realizarse por esquejes o semilla en laboratorio se obtiene un porcentaje de germinación mayor del 90%. La plantación en terreno de

³ Sistema Naturae 2000. <http://www.taxonomy.nl/taxonomicon/>

asiento debe efectuarse con planta obtenida en vivero-semillero. Entra en producción en el primer año de su plantación. Soporta bien las heladas del invierno y para obtener un buen rendimiento productivo precisa zonas altas con pluviometría superior a los 400-450 mm anuales. Su cultivo puede ser ampliamente mecanizado. Las partes utilizadas son hojas y sumidades floridas.

Consideraciones geográficas.

El material vegetal fue seleccionado de población espontánea de la zona de San Blas-Teruel. Las parcelas se encuentran ubicadas en dos COMARCAS representativas de este tipo de cultivos en ARAGÓN, Comarca de Teruel y Comarca de las Cinco Villas.

Los términos municipales elegidos para la instalación de las parcelas fueron:

- Barrio de San Blas (Teruel)
- Ejea de los Caballeros (Zaragoza).

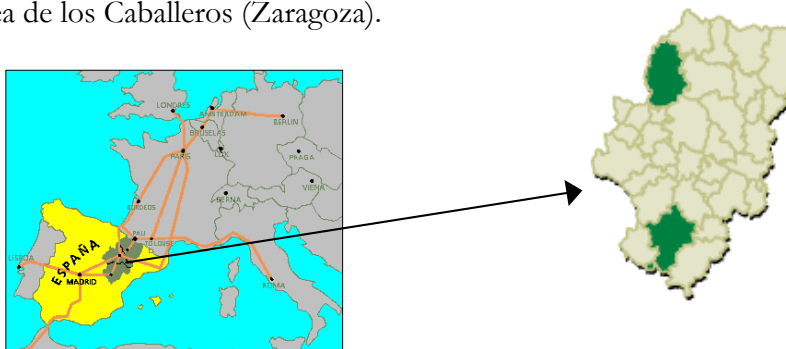


Figura 1. Localización geográfica de las parcelas

Características de la Parcela de Teruel:

Es una parcela de riego por goteo, cuyo cultivo se inició el día 7 de marzo de 2001, con planta a raíz desnuda obtenida de flora autóctona de la zona.

La altitud de la parcela es 915 m sobre el nivel del mar y el tipo de suelo presenta una textura franco-arcillosa.

El número de plantas puestas en fila es de 40 y su marco de plantación 1,50 x 0,40 (0,60 m²/planta). Número de plantas ha. 16.666.

Se realiza un muestreo de 30 plantas al azar.

Características de la Parcela de Ejea:

Es una parcela de riego por goteo, cuyo cultivo se inició el día 26 de febrero de 2002, con planta a raíz desnuda obtenida de flora autóctona de la zona de Teruel.

La altitud de la parcela 346 m. sobre el nivel del mar y el tipo de suelo presenta una textura franco-arcillo-arenosa.

El número de plantas puestas en fila: 40 y el marco de plantación es 3 x 0,50 (1,50 m²/planta). Se realiza un muestreo de 30 plantas al azar.

Variables controladas:

- Producción anual de biomasa pesada en campo.
- Estudio fenológico de la planta en el momento de la recolección.
- Porcentaje de marras (%).
- Producción anual y rendimiento de materia seca.
- Rendimiento y producción de aceite esencial.

Recolección y tratamiento de la materia vegetal:

Las muestras se recolectaron cuando las plantas se encontraban en estadio fenológico de plena floración. El material vegetal recolectado se sometió a un proceso de secado a la sombra, bajo corriente de aire, durante un periodo de 8 días.

Una parte de la materia seca, se destinó a la obtención de aceite esencial.

Cultivo de ajeno en condiciones controladas:

De una planta madre de ajeno procedente del CITA, se obtuvo material vegetal para ser cultivado en condiciones controladas (sustrato de vermiculita, solución nutritiva Nutrichem-60: 20-20-20, 3 g/l) se ha multiplicado vegetativamente y mantenido en cámara de crecimiento vegetal (25°C, 70% rh, 16:8 L:H). El material vegetal producido se ha recolectado, secado y extraído en etanol a temperatura ambiente (extracto etanólico) o destilado para la obtención del aceite.

Análisis químico

Se ha buscado la determinación de metabolitos secundarios de peso molecular bajo y medio (fracción de componentes volátiles), ya que entre ellos se encuentran los compuestos más frecuentemente responsables de bioactividad. Para ello se han utilizado los siguientes métodos:

1. Destilación en corriente de vapor. Es el método clásico para el aislamiento de la fracción volátil de una planta (aceite esencial) y se ha utilizado tanto en su versión normal, que da lugar a la obtención de aceite esencial en cantidad suficiente para llevar a cabo pruebas de actividad, como en la de microextracción-destilación simultáneas (SDE) que al requerir muestras del orden de 1-5 g permite el análisis de plantas individuales.
2. Desorción térmica directa⁴. Permite llevar a cabo el análisis cuali- y cuantitativo a partir de cantidades de planta de entre 2-10 mg. Con esta técnica pueden determinarse los componentes de bajo peso molecular de una planta sin dañar su desarrollo, lo que la hace especialmente indicada para seleccionar individuos para su posterior cultivo.^{5,6} También permite el análisis individual de partes de plantas (p.ej., flores y hojas).

Para la determinación cualitativa y cuantitativa de los compuestos presentes tanto en los aceites esenciales como en la fracción volátil obtenida por desorción térmica, se utiliza como metodología básica el acoplamiento cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS).

⁴ Esteban, J.L., Martínez-Castro, I., Sanz, J. (1993). Evaluation and optimization of the automatic thermal desorption (ATD) method in the gas chromatographic determination of plant volatile compounds. *J.Chromatogr.* 657:155.

⁵ Esteban, J.L., Martínez Castro, I., Morales, R., Fabrellas, B., Sanz, J. (1996). Rapid identification of volatile compounds in aromatic plants by ATD/GC/MS. *Chromatographia* 43:63-72.

⁶Esteban, J.L., Valero, E., Miranda, E., Jiménez, M.I., Martínez-Castro, I., Sanz, J., Morales, R. (1997). Automatic thermal desorption in the GC and GC/MS analysis of food volatile components using conventional and chiral capillary columns. *LC-GC Int.* 40-47.

Poblaciones y muestras de *A. absinthium*:

- SIERRA NEVADA (2003-2007): El origen de esta población es una donación del Vivero del Parque Nacional de Sierra Nevada. La población obtenida de esta planta fue cultivada en condiciones diferentes:
 - en cámara de cultivo, con sustrato inerte (vermiculita) y condiciones de luz y temperatura controladas (24°C, 16:8, L:O). De esta muestra se obtuvo el aceite esencial (**SNC03Ae**), los extractos de parte aérea y raíces (**SNC03ExA** y **SNC03ExR**) en el primer año de cultivo (2003) y los extractos de parte aérea y raíces (**SNC07ExA** y **SNC07ExR**) en el año 2007.
 - en invernadero, en macetas con tierra, obteniéndose el aceite esencial (**SNI05Ae**) y los extractos de parte aérea (**SNI05ExA**) en el año 2005 y (**SNI06ExA**) en el 2006.
- VILLACAMPA (2006): aceite esencial obtenido de una población silvestre de ajeno en Villacampa (Huesca) en el año 2006 (**VAe**).
- H: aceites esenciales y fracciones comerciales proporcionados por la empresa Hausmann Aromatic.
 - **1**: aceite esencial de ajeno de origen americano (**H1**).
 - **2**: fracción ligera de aceite esencial de ajeno, abundante en terpenos y tuyonas (**H2**).
 - **3**: fracción pesada de aceite esencial de ajeno con sesquiterpenos, ésteres y azulenos (**H3**).
- CITA: con muestras procedentes de Teruel (**CT**) y Ejea de los Caballeros (**CE**) se obtuvieron los siguientes extractos y aceites:

EJEA (CE):

 - aceites esenciales (2002-2006): **CE02Ae, CE03Ae, CE04Ae, CE05Ae, CE06 Ae**
 - extractos de parte aérea (2003-2006): **CE03ExA, CE05ExA, CE06ExA**

TERUEL (CT):

- aceites esenciales (2002-2006): **CT02Ae, CT03Ae, CT04Ae, CT05Ae, CT06Ae**
- extractos de parte aérea (2003-2006): **CT02ExA, CT05ExA**

FLUIDOS SUPERCRÍTICOS (FS):

Mediante extracción con CO₂ supercrítico de dos muestras de plantas de *A. absinthium* procedentes de Ejea de los Caballeros y Teruel, se obtuvieron varias fracciones, que tras su estudio por GS-MS, fueron reunidas para dar lugar a los extractos **FS1** y **FS2**.

Clave: **Ae**: aceite esencial; **Ex**: extracto; **A**: parte aérea; **R**: raíz.

2.2. Protozoos parásitos

2.2.1. *Leishmania infantum*

Para la realización de los ensayos de actividad leishmanicida se empleó la Cepa PB75 de *L. infantum*, procedente del Centro Nacional de Microbiología, Virología e Inmunología Sanitaria del Instituto de Salud Carlos III de Madrid.

Este protozoo flagelado aparece encuadrado en el Reino de los Protistas ingestadores, de la siguiente manera:³

Reino: Protozoa, Goldfuss, 1817

Subreino: Biciliata

Filo: Euglenzoa, Cavalier-Smith, 1981

Subfilo: Saccostoma, Cavalier-Smith, 1998

Clase: Kinetoplastea, (Honigberg, 1963) L. Margulis, 1974

Orden: Trypanosomatida, (Kent, 1880) Hollande, 1952

Familia: Trypanosomatidae, Doeflin, 1901

Género: *Leishmania*, Ross, 1903



Promastigotes de aprox. 25µm (SEM)

Las formas promastigote de *L. infantum* son mantenidas a 28° C en cultivo axénico, empleando medio RPMI 1640 (SIGMA) con un 10% de suero bovino fetal inactivado (30 minutos a 56° C). Se realizan pases semanales con un inóculo de 10⁶ promastigotes/ml para mantener los cultivos en fase de crecimiento exponencial, aspecto necesario para la realización de los ensayos de cribado.

Utilizamos RPMI sin rojo fenol para *Leishmania spp.*, ya que el rojo fenol produce interferencias a la hora de la lectura de resultados con el MITT.⁷

La conservación de la cepa se lleva a cabo por criopreservación a (-80°C) centrifugando la suspensión de promastigotes (1500 rpm durante 10 minutos) y resuspendiendo el sedimento obtenido en medio de cultivo con un 5% de DMSO.

2.2.2. *Trypanosoma cruzi*

Para realizar los ensayos de actividad tripanocida se empleó la cepa Y de *T. cruzi*, aislada por el Prof. Pedreira de Freitas en 1950 de un caso humano agudo procedente de Marilia (Sao Paulo Brasil). Caracterizada morfológicamente por Silva y Nussenzweig (1953), fue donada por el Prof. Dr. D. Miguel Belda Neto de la Universidad de Araraquara (Brasil) en el año 1985.

Clasificación:³

Reino: Protozoa, Goldfuss, 1817

Subreino: Biciliata

Filo: Euglenzoa, Cavalier-Smith, 1981

Subfilo: Saccostoma, Cavalier-Smith, 1998

Clase: Kinetoplastea, (Honigberg, 1963) L. Margulis, 1974

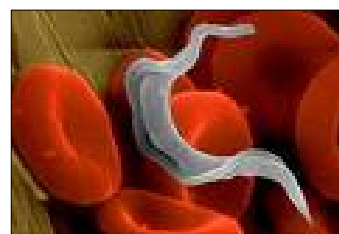
Orden: Trypanosomatida, (Kent, 1880) Hollande, 1952

Familia: Trypanosomatidae, (Doflein, 1901) Grobstein, 1905

Género: Trypanosoma, Gruby, 1843

Subgénero: Schizotrypanum, (Chagas, 1909) Nöller, 1931

Especie: *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* Chagas, 1909



Promastigotes de aprox. 25 µm (SEM)

Las formas epimastigote de *T. cruzi* son mantenidas a 28°C en cultivo axénico, empleando medio de cultivo LIT (Liver Infusion Tryptose) con un 10% de suero bovino fetal inactivado (30 minutos a 56° C). Para ello se mezclan todos los productos y soluciones de la tabla 1, se ajusta el pH a 7.4 con HCl y se esteriliza por filtración. Tanto

⁷ Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. J. Immunol. Methods. 65:55-63.

el mantenimiento como la criopreservación se llevan acabo siguiendo el mismo protocolo que se usa para *L. infantum*.

Tabla 1. Composición del medito de cultivo LIT (100 ml).

Liver Infusion Broth	0.225 g
Triptosa	0.45 g
ClNa	0.36 g
Glucosa	0.18 g
KCl	0.036 g
Na ₂ HPO ₄	0.2835 g
SBFi	10 ml
Antibiótico	180µl
Hemina	90 µl (25 mg/ml)
Agua destilada	90 ml

2.3. Insectos diana

2.3.1. Insectos masticadores

Spodoptera littoralis (B.). Rosquilla negra.

Clasificación:⁸

-Phylum: Artropoda

-Clase: Insecta

-Orden: Lepidoptera

-Superfamilia: Noctuidea

-Familia: Noctuidae

-Género: *Spodoptera*

-Especie: *Spodoptera littoralis*



Spodoptera littoralis

⁸Balachowsky, A.S. (1972). Entomologie Appliquee a L' Agriculture. Traité Tome II Lèpidopterès. Ed. MassonE T Cie. 1050-1627.

La oruga es de color negruzco y se arrolla en espiral. Presenta seis estadios larvales y en su mayor desarrollo puede alcanzar de 3, 5 a 4 cm de longitud. Los adultos se caracterizan por llevar dibujado en las alas anteriores, un 4 en la derecha y su simétrico en la izquierda.

2.3.2. Insectos chupadores

Fitófagos:

Myzus persicae (S.). Pulgón verde del melocotonero.

Clasificación:⁹

- Phylum: Artropoda
- Clase: Insecta
- Orden: Hemiptera
- Suborden: Homoptera
- Superfamilia: Phytophagoidea
- Familia: Aphididae
- Tribu: Macrosiphini
- Género: *Myzus*
- Especie: *Myzus persicae*



Myzus persicae

Es un pulgón de tamaño medio, de 1.2 a 2.3 mm. Las formas ápteras presentan color verde-amarillento y entre verde y negro las formas aladas.

Rhopalosiphum padi (L). Pulgón de la avena

Clasificación:⁹

- Phylum: Artropoda
- Clase: Insecta
- Orden: Hemiptera
- Suborden: Homoptera
- Superfamilia: Phytophagoidea



R. padi

- Familia: Aphididae
- Tribu: Aphidini
- Género: *Rophalosiphum*
- Especie: *Rophalosiphum padi*

Su tamaño varía entre 1.2 y 2.4 mm, su color va desde el verde al negro grisáceo, aunque generalmente es de color verde oliva.

Hematófagos:

***Rhodnius prolixus* (S)**

Es un heteróptero triatomino y el segundo vector más importante después de *Triatoma infestans* de la enfermedad de Chagas.¹⁰ Esta enfermedad está causada por el protozoo parásito *Trypanosoma cruzi*.

Vulgarmente se le llama chipo o pito, especialmente en Venezuela y Colombia.

Clasificación:¹¹

- Phylum: Artropoda
- Clase: Insecta
- Orden: Hemiptera
- Suborden: Heteroptera
- Grupo: Cimicomorpha
- Superfamilia: Reduvioidea
- Familia: Reduviidae, Latreille, 1807
- Subfamilia: Triatominae, Jeannel, 1919
- Género: *Rhodnius*
- Especie: *Rhodnius prolixus* Stål



R. prolixus

⁹ Blackman, R.L., Eastop, V.T. (1984). Aphids on the world's crops. An identification guide. Ed. Wiley-Interscience Publications.

¹⁰ Yamagata, Y., Nakawama, J. (2006). Control of Chagas disease. Adv. Parasit. 61: 129-165.

¹¹ Stål, C. (1859). Monographie der Gattung Conorhinus und Verwandten. Berl. Entomol. Zeitschrift 3, 99-117.

La colonia de *Rhodnius prolixus* empleada fue cedida a nuestro laboratorio por el Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III.

Este redúvido presenta cinco estadios ninfales. La hembra puede ser fecundada de uno a tres días tras la última muda, y se inicia la oviposición tras 9-22 días (variando con la ingesta). Los huevos son puestos aislados o en pequeños grupos en un número variable, y en general, en 8-10 días son incubados.

2.3.3. Cría y mantenimiento de los insectos

Todas las poblaciones de insectos, excepto los hematófagos (*R. prolixus*) se mantuvieron en cámaras climatizadas en a una temperatura de $22 \pm 1^\circ \text{C}$, humedad relativa: 60-70% y fotoperiodo 16:8 (L:O).

Insectos masticadores:

La cría y mantenimiento de *S. littoralis* se llevó a cabo en recipientes de plástico de diferentes tamaños, según el estadio larval, tamaño y número. Las larvas se alimentaron en una dieta artificial general para noctúidos¹² y los adultos con una solución azucarada.

Tabla 2. Composición de la dieta artificial para *S. littoralis*

Agua destilada	1000ml
Agar	2.5 g
Ac.benzóico	1.25 g
Sémola maíz	140 g
Germen de trigo	35 g
Levadura cerveza	37.5 g
Ac.ascórbico	5 g
Nipagin	1 g
Sales minerales	1.55 g
Vitaminas	12 g

¹² Poitut, S., Bues, S. (1970). Elevage de plusieurs especes de Lepidopteres Noctuidae sur milieu artificiel simplifié. Ann. Zool. Ecol. Anim., 2: 79-91.

Insectos chupadores fitófagos:

De forma general, las especies de pulgones se criaron en cámaras climatizadas sobre sus hospedadores secundarios. *M. persicae* sobre plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L. var. California Wonder) cubiertos de conos de plástico ventilados de 22,4 cm de altura, transfiriéndose a plantas de pimiento frescas cada 7-10 días y manteniéndose en las mismas condiciones. *R. padi* se criaron sobre plantas de cebada (*Hordeum vulgare* L.) en las mismas condiciones descritas para *M. persicae*.

Insectos chupadores hematófagos:

Los insectos son mantenidos en estufa incubadora a una temperatura constante de 26-28° C, en frascos de vidrio con papel de filtro en el fondo y la zona central del frasco, sirviendo de soporte para que los insectos puedan trepar. En este papel las hembras suelen depositar los huevos.

Tapando los frascos se colocan trozos de tela de nylon porosa que permita la protusión a través de los aparatos picadores de los insectos a la hora de la alimentación.

El mantenimiento rutinario de la colonia se realiza una vez al mes y en caso de que se necesite aumentar la tasa de reproducción, se puede aumentar el número de tomas hasta una por semana.

Se utilizan cobayas (Animalario, Facultad de Medicina, UAM) a los que se rasura el abdomen y se limpia con un algodón humedecido. A continuación se aplica el frasco que contiene los insectos de modo que la tela de nylon de su embocadura contacte con la piel del abdomen del animal.

El frasco se mantiene sobre la piel del cobaya el tiempo suficiente para que se alimenten todos los insectos (normalmente entre 10 y 30 minutos), esto se comprueba observando la dilatación del abdomen de los insectos debida a la ingestión de sangre.

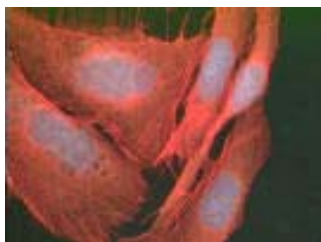
2.4. Cultivos celulares

2.4.1. Línea celular CHO (Células de ovario de hamster chino)

Para la realización de los ensayos de citotoxicidad inespecífica se emplearon células de ovario de hamster chino (*Cricetulus griseus*) pertenecientes a la línea CHO (de

morfología epitelial) procedente de la ECACC (European Collection of Cell Cultures); referencia: ECACC n° 85050302.

Se mantienen en medio de cultivo RPMI-1640 con rojo fenol (GIBCO) suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS), 1% de L- glutamina (200 mM in 0,85% ClNa Bio Whittaker Europe) y 1% de antibióticos penicilina-estreptomicina (10000 U. penicilina/ml y 10000 µg estreptomicina/ml de Bio Whitaker Europe).



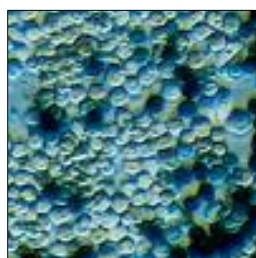
CHO con microscopía de fluorescencia

El cultivo se realiza en frascos Roux de 25 cm³ incubados a 37°C en atmósfera enriquecida con un 5% de CO₂. Las células crecen adheridas en monocapa, siendo redondas al principio y más tarde alargadas. Cuando llegan a estar confluentes se despegan del frasco de crecimiento celular para realizar una siembra controlada en nuevos frascos.

Para la conservación de la línea, las células se mantienen congeladas a una temperatura de -80° C, habiéndolas previamente centrifugado (1000 rpm durante 5 minutos) y resuspendido el sedimento en 1 ml de SBF con DMSO al 9%.

2.4.2. Línea celular Sf9 (Células de ovario de pupa de *Spodoptera frugiperda*)

La línea celular de insecto Sf9 (células de ovario de pupa de *Spodoptera frugiperda*) procede de la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC). El cultivo se



Células Sf9 (20 µm) M.E.

mantiene a 27°C en medio TC 100 Insecta (SIGMA), suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF), 1% de L- glutamina (200 mM in 0.85% ClNa Bio Whittaker Europe) y 1% de antibióticos Penicilina-estreptomicina (10000 U. penicilina/ml, 10000 µg estreptomicina /ml de Bio Whitaker Europe). Las

células Sf9 se cultivan en monocapa y su morfología es redonda durante todo el cultivo. Tanto su mantenimiento como su criopreservación, se llevan a cabo con el mismo protocolo usado para la línea celular CHO.

2.5. Hongos fitopatógenos

Los hongos fitopatógenos seleccionados para llevar a cabo los corresponden a tres especies del género *Fusarium*: *F. moniliforme* (Sheldon), *F. oxysporum* fs. *lycopersici* (Scheldt) y *F. solani* (Mart), causantes de importantes daños y pérdidas en la agricultura. Estas especies se obtuvieron de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), y tienen los códigos 2152, 2715 y 2199, respectivamente.



El género *Fusarium* pertenece al grupo de los Deuteromicetes, relacionándose la formas asexuales *Fusarium solani* y *Fusarium moniliforme* con las formas Ascomicetas *Nectria haematococca* (Berkeley & Broome), y *Giberella fujikuroi* (Sawada) Ito respectivamente.

El mantenimiento de las colonias se realizó en medio PDA comercial (Oxoid) en placas Petri. A la hora de preparar el medio de cultivo se le añadió el antibiótico cloranfenicol (50 mg/l) para evitar la proliferación de microorganismos. Las placas se mantuvieron en la oscuridad y en una estufa, a 27 ° C. De manera periódica se realizaron resiembras para mantener las colonias en condiciones óptimas. Al mismo tiempo se tomaron tacos de agar de las diferentes placas y se transfirieron a eppendorf con glicerol al 18% para su conservación a -80° C.

2.6. Semillas

La especie vegetal *Lactuca sativa* L. var. carrascoy se emplea habitualmente en los estudios de interacciones alelopáticas. Esta variedad de semillas (certificadas, de Arnedo, La Rioja) ha sido seleccionada por su capacidad germinativa (< 24h).

También se han utilizado para este tipo de estudios semillas de trigo de la variedad astral (*Triticum aestivum* L.) así como de cebada (*Hordeum vulgare* L.).

*Lactuca sativa* L.*Hordeum vulgare* L.*Triticum aestivum* L.

3. Soluciones, colorantes, reactivos y fármacos de referencia.

MYF b (tintura de yodo)

Yodo metálico.....5 g
 Yoduro potásico.....10 g
 Agua destilada.....100 ml

Solución MTT (Bromuro de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5- difenil tetrazolio):

- **2,5 mg/ml MTT** con **PMS** (fenazina metosulfato) para ensayos con parásitos.

MTT(Sigma)12.5 mg
 PMS (Sigma).....1.117 mg
 PBS.....5 ml

- **5 mg/ml** en PBS para las pruebas con la línea celular CHO.

Solución de SDS (dodecil sulfato sódico)10% HCl 0,01 N

SDS10 g
 HCl31,5 mlAgua destilada100 ml

Hemina

Hemina (Sigma) 25 mg
 NaOH 1N.....1 ml

Azúl de Tripan

Azúl de Tripan.....10 ml

PBS.....90 ml

Oleum: revelador utilizado en las cromatografías en capa fina

H₂O:15 ml

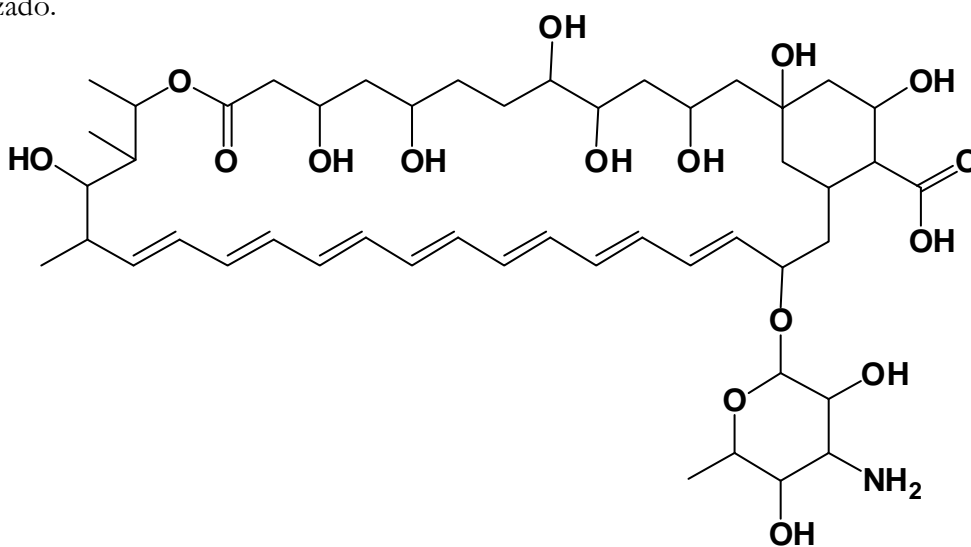
CH₃COOH:80 ml

H₂SO₄:5 ml

Fármacos y compuestos de referencia

Anfotericina B (GIBCO):

Antifúngico con importante actividad leishmanicida, usado desde 1984 para el tratamiento de la leishmaniasis tanto cutánea como visceral.¹³ Se ha observado que la actividad de este antibiótico presenta variaciones en función de la especie y el modelo utilizado.



¹³ Croft SL *et al.* (1991). Liposomal Amphotericin B in the treatment of visceral leishmaniasis. J Antimicrob Chemother.;28 Suppl B: 111-8.

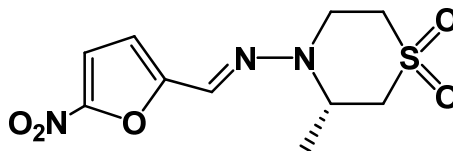
Actividad de la Anfotericina B sobre
Leishmania spp.

Especie	Anfotericina B(DE ₅₀)
<i>L. infantum</i>	0.014 ± 0.005 µM ¹⁴
<i>L. amazonensis</i>	0.016 ± 0.005 µM ¹⁴
<i>L. mexicana</i>	0.038 ± 0.005 µM ¹⁵

DE₅₀: dosis capaz de producir un 50% de actividad

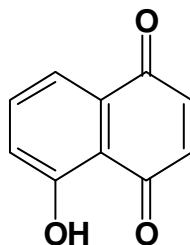
Nifurtimox (Lampit, BAYER 2502)

Es el fármaco de referencia utilizado en los ensayos frente a *T. cruzi* y presenta una ED₅₀ = (2,3 µg/ml)



Juglone (SIGMA)

Compuesto fenólico comercial de conocida actividad alelopática.¹⁶ Es usado como referencia en los ensayos de fitotoxicidad.



¹⁴ Sereno D, Lemesre JL. (1997). Axenically cultured amastigote forms as an in vitro model for investigation of antileishmanial agents. Antimicrob. Agents Chemother. May. 972-976.

¹⁵ Ridoux O, Giorgio C Di, et al. (2001). In vitro antileishmanial activity of three saponins isolated from Ivy, α-Hederin, β- Hederin and Hederacolchiside A₁, association with Pentamidine and Amphotericin B. Phytother Res. 15: 298-301.

¹⁶ Kocaçaliskan, I., Terzi, I. (2001). Allelopathic effects of walnut leaf extracts and juglone on seed germination and seedling growth. J. Hortic. Sci. Biotech. 76:436-440.

4. Ensayos de actividad biológica

4.1. Ensayos de actividad antiparasitaria

Los ensayos de actividad sobre *L. infantum* y *T. cruzi* permiten determinar la capacidad citostática o citocida de un producto, comparando el crecimiento de un cultivo en fase de crecimiento exponencial tratado con respecto a un control sin tratar.

Aplicando la técnica de reducción del MTT se determina la densidad de epi/promastigotes en cada pocillo mediante la lectura de la absorbancia a 570 nm, lo cual permitirá el cálculo de la actividad anti-epi/promastigote (AP/AE).

$$\%A=100-[(A_p-A_b)/(A_c-A_b)\times 100]$$

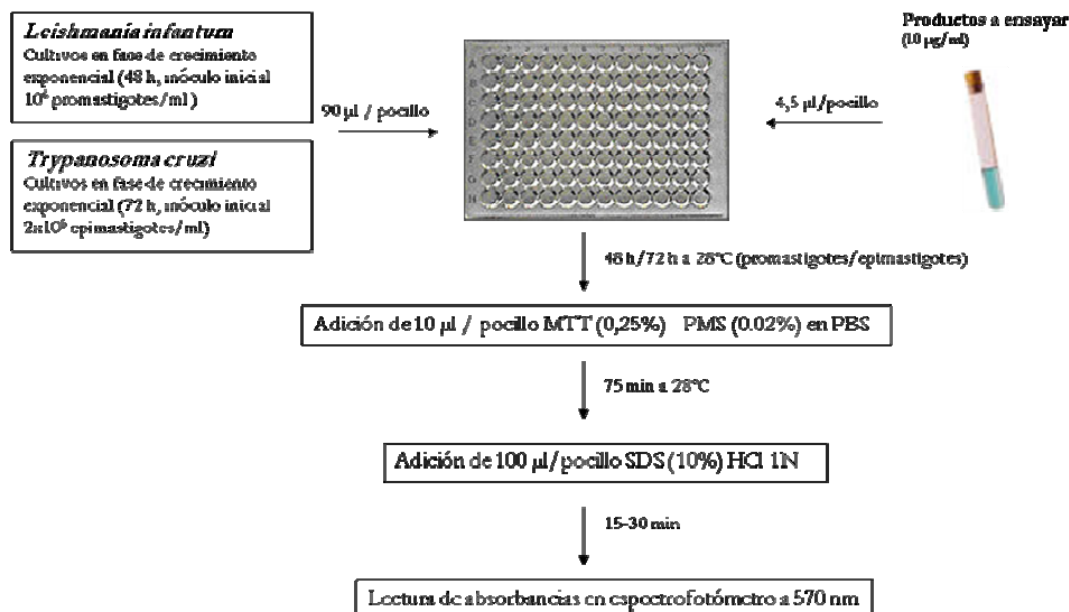
Ap: absorbancia del problema

Ab: absorbancia del blanco

Ac: absorbancia del control

Como fármacos de referencia se han utilizado anfotericina B y nifurtimox para las pruebas con *L. infantum* y *T. cruzi* respectivamente. En el caso de que los productos en estudio resulten activos, se realizan ensayos a diferentes dosis con el fin de determinar la relación dosis–respuesta. Esto nos permite determinar la **Dosis Eficaz 50** (dosis que produce una mortalidad del 50%) mediante regresión logarítmica con el programa STATGRAPHICS plus5.1.

Ensayos de actividad antiparasitaria



4.2. Bioensayos con insectos

4.2.1. Bioensayos de comportamiento

Con este tipo de ensayos se determina la capacidad repelente o antialimentaria de los productos y/o extractos.

- **Bioensayo de elección** (dos vías)

Con este tipo de bioensayos se pretende analizar la capacidad repelente de un producto a corto plazo. Se observa la preferencia de larvas del sexto estadio (L6) de *S. littoralis* por discos de hojas (tratados y control) de la planta huésped *C. annuum*, colocados en las misma placa Petri. La superficie de los discos (1 cm²) es tratada superficialmente con la sustancia a probar. Cada tratamiento consiste en 5 placas Petri con 2 insectos cada una, de acuerdo con la metodología descrita por *González Coloma et al.*^{17,18} Una vez consumido un 75% de la superficie de los discos control, las superficies

¹⁷ González-Coloma, A., Cabrera, R., Castañera, P. and Gutiérrez, C. (1995). Antifeedant and toxic effects of sesquiterpenes from *Senecio Palmensis* to Colorado potato beetle. J. Chem. Ecol. 21: 1255-1270.



Bioensayo de elección
con *S. littoralis*

foliares no consumidas (control y tratamiento) se midieron de acuerdo con la metodología de Escoubas *et al.*,¹⁹ utilizando el programa de análisis de imagen Image J.

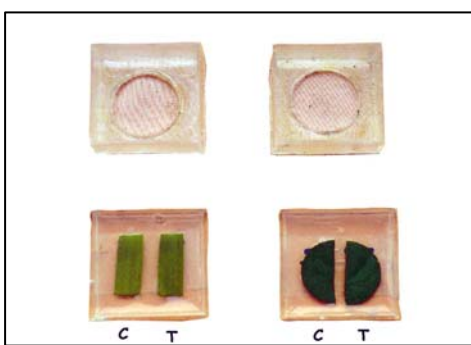
Posteriormente se calculó el índice de consumo, %FR,²⁰ considerándose que un extracto es activo cuando su FR >75%

$$FR = 1 - (T/C) \times 100\%$$

T: consumo del tratamiento; C: consumo del control

En el caso de los áfidos, este tipo de ensayo determina el efecto de los compuestos sobre el asentamiento de las diferentes especies de pulgones. En cada experimento se utilizaron cajas de plástico de 3 x 3 x 1.5 cm, tapadas y con ventilación, colocándose en la tapa una capa muy fina de agar (2.5%).

Con *M. persicae* se emplearon medios discos de hojas de *C. annuum*,²¹ mientras que con



Bioensayos de elección con áfidos en planta
huésped, cebada (izq.) y pimiento (dcha).
C=Control, T=Tratamiento

R. padi se utilizaron dos fragmentos de un foliolo de *H. vulgare*, de 1 cm² de superficie cada uno, por caja. Cada medio disco o fragmento de foliolo se trató con una solución del compuesto a ensayar (tratamiento) en acetona y la otra mitad o fragmento con el disolvente (control).

Se aplicaron en 20 cajas con 10 insectos cada una y se incubaron a 22 ± 1 °C y un fotoperiodo

¹⁸ González-Coloma, A., Terrero, D. Perales, A., Escobas, P., Fraga, B.M. (1996). Insect antifeedant ryanodane diterpenes from *Persea indica*. J. Agric. Food Chem. 44: 296-300.

¹⁹ Escoubas, P., Lajide, L., Mizutni, J. (1993). An improved leaf-disk antifeedant bioassay and its application for the screening of Hokkaido plants. Entomol. Exp. Appl. 66:99-108.

²⁰ Bentley, M.D., Stoddard, W.F., Zalkow, L.H. (1984). Pyrrolizidinealkaloids as larval feeding deterrents for spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* (Lepidoptera: Tortricidae). Ann. Entomol. Soc. Am. 77: 393.

²¹ Gutiérrez, C., Fereres, A., Reina, M., Cabrera, R., González-Coloma, A. (1997). Behavioral and sub-lethal effects of structurally- related lower terpenes on *Myzus persicae*. J. Chem. Ecol. 23: 1641-1650.

16:8 (L:O) en posición invertida. Después de 24 h se contaron los pulgones asentados en el tratamiento y en el control, calculándose el índice de inhibición del asentamiento, %SI, para cada tratamiento:

$$\%SI = [1 - (\%T / \%C)] \times 100$$

%T: porcentaje de pulgones sobre la superficie tratada

%C: porcentaje de pulgones sobre la superficie control

Los extractos crudos se ensayaron a una dosis inicial de 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ y los productos puros a 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.²² Los productos que a esta dosis presentaron un índice de repelencia significativo, se sometieron a experimentos dosis-respuesta para poder calcular sus dosis efectivas (EC_{50} = dosis a la cual se produce un 50% de inhibición de alimentación) mediante análisis de regresión lineal utilizando el programa estadístico STATGRAPHIC Plus v. 5.1.

En todos los ensayos con pulgones se compararon las medianas mediante el test de Mann-Whitney W de los porcentajes de pulgones sobre el control y el tratamiento, partiendo de la hipótesis de que la mediana del control es mayor que la mediana del tratamiento.

Por otro lado, los ensayos realizados con los redúvidos de la especie *R. prolixus* se llevaron a cabo en sistemas compuestos por dos matraces erlenmeyer conectados en su base por un tubo de vidrio hueco de 10 cm de longitud y 1.5 cm de diámetro. En cada uno de ellos se deposita un disco de papel de filtro de 25 mm de diámetro (Filter-Lab 1250) impregnado con una solución del producto a ensayar (tratamiento) o con el disolvente (control), utilizando las mismas dosis que en el ensayo con áfidos descrito anteriormente.

Se depositan 3 chinches adultas, que hayan efectuado la última toma de sangre al menos 24 horas antes del ensayo, en cada uno de los matraces del sistema. Una vez cubiertos los dos matraces con parafilm perforado, se depositan los recipientes en la

²² Kubo, I. (1991). Screening techniques for plant-insect interactions. 179-193. Methods in Plant Biochemistry.. Vol. 6. Assays for Bioactivity (K. Hostettman ed.) Academic. Press. New York.

estufa incubadora a 28°C en oscuridad, donde posteriormente se realiza la observación de la localización de los insectos a intervalos de 5 minutos hasta llegar a una hora. El ensayo se repite al menos 4 veces para cada producto y concentración.

En este caso calculamos el índice de repelencia (RI):

$$\%RI = [1 - (\%T / \%C)] \times 100$$

%T: porcentaje de chinches en el matraz del tratamiento
 %C: porcentaje de chinches en el matraz control

El tratamiento de los datos se determina de la misma forma que en el ensayo de áfidos, por comparación de medianas mediante el test de Mann-Whitney W.

4.2.2. Bioensayos de toxicidad

Estos ensayos nos permiten diferenciar los compuestos repelentes de los tóxicos y/o inhibidores del crecimiento.

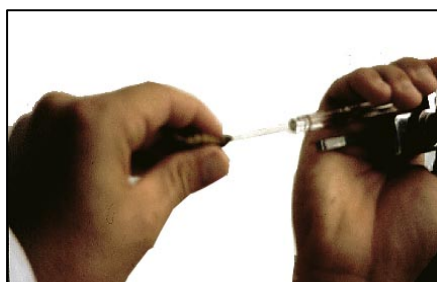
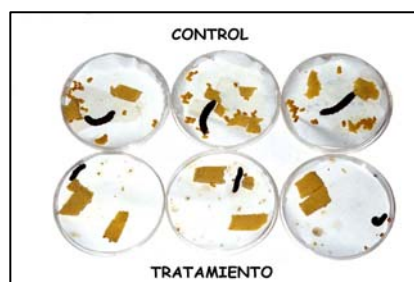
- Canulación oral de *S. littoralis*

Se utilizaron larvas de *S. littoralis* L6, de 24 horas, con un peso aproximado de 400 mg que se colocaron en placas Petri con una cantidad conocida de dieta artificial.

Cada experimento constó de 20 larvas. A cada una de estas larvas se les canuló oralmente con 40 µg del compuesto a probar, disuelto en 4 µl de DMSO (tratamiento) o sólo con el DMSO (control), según la metodología descrita por González Coloma *et al.*²³ En el caso de los experimentos llevados a cabo con sinergistas, previamente a la canulación, se administró por vía tópica 20 µg del sinergista en 2 µl de acetona sobre el abdomen de cada larva.

Al final del experimento (72 h) se calculó el consumo de alimento (ΔI) y el crecimiento relativo (ΔB) de las larvas en base a los pesos secos, todo ello expresado como porcentaje del control en las tablas.

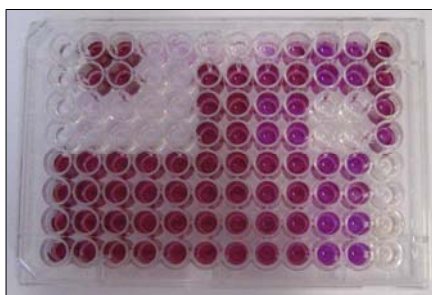
²³ González-Coloma, A., Guadaño, A., Gutiérrez, C., Cabrera, R., de la Peña, E., de la Fuente, G. Reina, M. (1998). Antifeedant *Delphinium* diterpene alkaloids. Structure-activity relationships. J. Agric. Food Chem., 46: 286-290.

Bioensayo de toxicidad con *S. littoralis*.Canulación de *S. littoralis*

Se realiza un primer análisis de covarianza (ANCOVA I) con el peso inicial de las larvas como covariable, para valorar el efecto del tratamiento/s sobre el ΔB e ΔI . En caso de resultar significativos, los efectos del tratamiento sobre el ΔB , se realiza un segundo análisis de covarianza (ANCOVA 2) sobre el incremento del peso con el consumo de alimento como covariable, para estudiar los efectos post-ingestivos del tratamiento con independencia del consumo.^{24,25}

4.3. Ensayos de citotoxicidad

Permiten determinar la citototoxicidad inespecífica de un producto mediante la comparación del crecimiento celular en pocillos tratados y sin tratar tras 48 horas de contacto. Se llevan a cabo con las líneas celulares CHO y Sf9 utilizando placas de microtitulación de 96 pocillos, donde se evalúa la viabilidad celular mediante el método de reducción del MTT según el protocolo de Mosmann.⁷



Placa de microtitulación una vez finalizado el ensayo

²⁴ Horton, R.D., Redak R.A. (1993). Further comments on analysis of covariance in insect dietary studies. Entomol. Exp. Appl. 69: 263-275.

²⁵ Raubenheimer, D., Simpson, S.J. (1992). Analysis of covariance: an alternative to nutritional indices. Entomol. Exp. Appl. 62: 221-231.

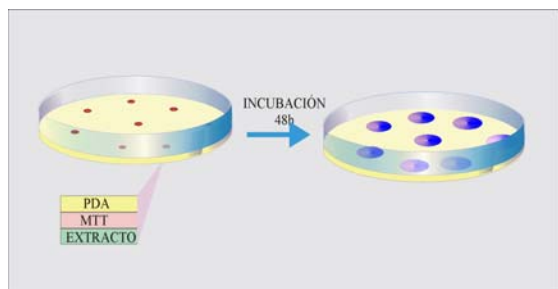
Los ensayos se realizan siguiendo el mismo protocolo para las dos líneas celulares con la diferencia de que para las CHO se emplea una suspensión celular de 10.000 células/100 µl y en el caso de la línea SF9 son 40.000/100 µl, cada una con su respectivo medio de cultivo (RPMI y TC-100).

Para realizar la lectura se añaden 10 µl de MTT de una solución de 5 mg/ml en PBS a cada pocillo y se incuba 4 horas a 37° C. Después se aspira el medio y se añaden 100 µl de DMSO por pocillo. Por último, se realiza la lectura al espectrofotómetro a 570 y 620 nm (absorbancia de referencia), obteniéndose los datos de la diferencia de absorbancias a ambas longitudes de onda (570-620).

Con las absorbancias obtenidas se calcula el porcentaje de viabilidad celular, el cual nos va a permitir determinar la **DE₅₀** mediante regresión logarítmica (STATGRAPHICS Plus versión 5.1).

4.4. Bioensayos con hongos fitopatógenos.

Este tipo de bioensayo está bien descrito en la literatura. El tamaño de la placa es variable, prefiriéndose placas Petri de pequeño diámetro cuando se tiene mucha cantidad de extracto, realizando una sola siembra por placa de 6 cm de diámetro²⁶ o de 9 cm²⁷ o como en nuestro caso, usando placas de 9 cm y realizando varias siembras en cada una. El extracto obtenido de la planta se incorpora al medio de cultivo en una

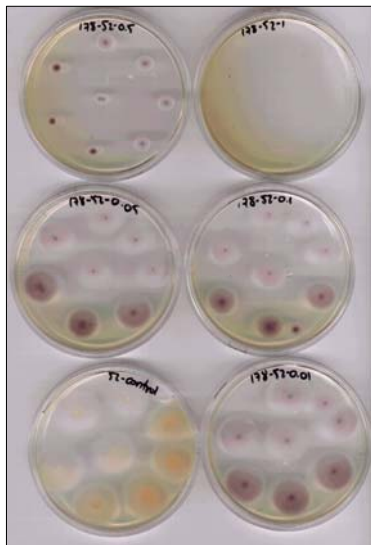


concentración P/V definida. El extracto se diluye en etanol y luego se incorpora al medio de cultivo licuado. El porcentaje final de etanol en el medio se ajusta a una concentración del 2% que no afecta al crecimiento del hongo por

lo que no interfiere con la actividad del extracto, si la tuviera. Paralelamente se preparan

²⁶ Elmer, W.H., Incordia, M.J., Maceachern, G.J. (1994). Sensitivity of plant pathogenic fungi to taxane extracts from ornamental yews. *Phytopathology*. 65:114-122.

placas Petri en blanco donde el medio de cultivo no lleva extracto y la concentración de etanol es similar a la existente en las placas de los bioensayos. Para los extractos acuosos, las concentraciones finales fueron de 20, 10 y 1% (V/V), y en este caso al control se le



añadía agua en las mismas proporciones.

En cada placa se dispensan 5 ml de medio preparado como se indicó en el párrafo anterior. Luego en cada placa se realizan ocho siembras por picadura distribuidas uniformemente de tal manera que al desarrollarse las colonias no interfieran unas con otras. Se incuban en oscuridad a una temperatura de 27°C durante 48 horas. Para la siembra hemos partido de colonias bien desarrolladas (5-8 días de edad).

La toma de datos se realiza midiendo el diámetro de cada colonia. Para ello hemos digitalizado la imagen de la placa del ensayo; primero se escanea la placa y luego medimos el diámetro de cada colonia con el programa SIGMASCAN, usando como unidades el pixel. El porcentaje de inhibición del crecimiento (%I) se calcula comparando el diámetro de las colonias que han crecido a las diferentes concentraciones de extractos con el crecimiento de las colonias en las placas control, según la formula siguiente:

$$\%I = [C - T / C] \times 100$$

C = Diámetro de la colonia en el control

T = Diámetro de la colonia en el tratamiento

Para cada concentración del extracto se tomaron medidas de 8 colonias con las que se calculó el porcentaje medio de inhibición. Según el método descrito, en cada placa se dispensaban 5 ml de medio, que en el caso de usar el extracto en concentraciones de 1 mg/ml supone una cantidad total de 5 mg de extracto por cada

²⁷ Murabayashi, A., Masuko, M., Niikawa, M., Shirane, N., Furuta, T., Makisumi, Y. (1991). Antifungal and plant growth inhibitory activities of stereo and optical isomers of 2-triazolylcycloalkanol derivatives. J.Pesticide Sci. 12: 419-427.

hongo diana. Por lo tanto, para realizar un ensayo a las 5 concentraciones empleadas con una especie de hongos se gastan 8.3 mg de extracto.

Este sistema tiene el inconveniente de que si el borde de la colonia es tenue, es muy difícil definir su límite. Para solventar esta dificultad añadimos sales de tetrazolio al medio de cultivo (MTT) a una concentración de 0.1 mg de sal por ml de medio, que no interfiere con el crecimiento del hongo, pero hace que éste muestre una coloración más oscura, por lo que al escanear las imágenes el borde de las colonias se puede delimitar con mayor precisión.

El cálculo de la concentración eficaz que inhibe el 50% del crecimiento (EC50) se ha realizado usando el método de Lichtfield & Wilcoxon para el cálculo de la EC50 y sus límites de confianza.

4.5. Bioensayos de fitotoxicidad.

El efecto de los diferentes compuestos en la germinación y longitud de la radícula de las semillas de *L. sativa* se estudió mediante un bioensayo en cámara de cultivo vegetal con un fotoperiodo 16:8 (L:O) a 23-24° C de temperatura.

Las semillas se colocaron en cajas de 2 cm de diámetro con 5 g de arena calibrada (Nº 6), sobre la que se coloca un papel de filtro Whatman (Nº 1) de 2 cm de diámetro tratado con cantidades variables del compuesto a estudiar.



Bioensayos de germinación con *L. sativa*

Los controles se preparan del mismo modo con los disolventes puros. Una vez evaporado el disolvente puro, se humedecieron los papeles de filtro con 2 ml de agua destilada. Las cajas, se incubaron en las condiciones descritas, durante seis días (144 h), contándose el número de semillas germinadas a intervalos de 24 h. Al final del

experimento se midió la longitud radicular y las anormalidades radiculares presentes. El efecto del tratamiento se comprueba mediante un análisis ANOVA del tratamiento y si es significativo se comparan las medias mediante Fisher's LSD test .

En el caso de los experimentos con trigo (*T. aestivum* L.) así como de cebada (*H. vulgare* L.) las condiciones del ensayo fueron las mismas que las empleadas con *L. sativa*, con la única diferencia de que las cajas y los filtros utilizados presentan un diámetro de 5 cm, siendo 4 veces mayor la cantidad aplicada para mantener la misma relación mg/cm².

5. Fraccionamiento químico biodirigido:

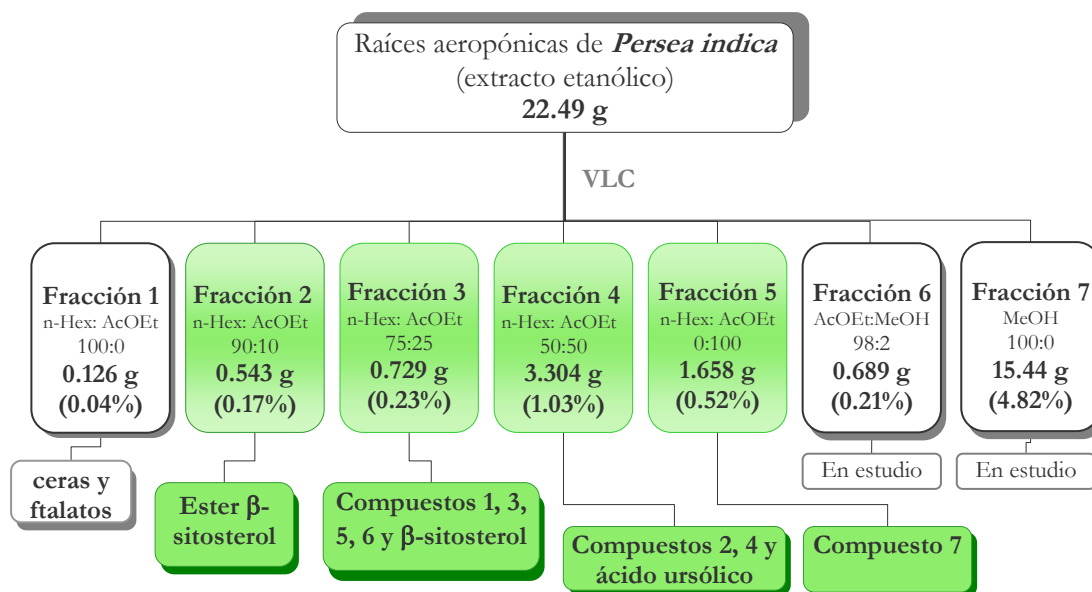
5.1. *Persea indica* (L.)

5.1.1. Obtención del extracto crudo.

Las raíces de *Persea indica* (320 g de peso seco) procedentes de cultivo aeropónico fueron recolectadas durante un período de un año y extraídas por maceración en etanol a temperatura ambiente. Se obtuvieron 22.49 g extracto con un rendimiento del 7%.

5.1.2. Fraccionamiento.

Una vez obtenido el extracto crudo, se procedió a comprobar su actividad mediante los bioensayos anteriormente descritos. Una vez determinados los tipos y niveles de actividad del extracto frente a los distintos especies biomodelos, se decidió proceder a su fraccionamiento químico mediante diferentes técnicas cromatográficas: cromatografía líquida de vacío (VLC), cromatografía en columna de gravedad (CC), cromatografía en sephadex (SPH), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y cromatografía en capa fina analítica (CCF).

Esquema 1. Fraccionamiento de *P. indica*

El primer fraccionamiento se realizó mediante VLC [6cm (alto) x 12 cm (diámetro)], partiendo de 22.49 g de extracto crudo y eluyéndose con un gradiente de polaridad creciente de n-Hex:AcOEt y AcOEt:MeOH, obteniéndose 7 fracciones.

❖ **Fracción 1:** ceras y ftalatos.

❖ **Fracción 2** (0.543 g):

Mediante n-Hex: AcOEt en proporción 90:10, y tras realizar una cromatografía líquida de vacío un HPLC aislamos un éster del β-sitosterol (1.3 mg, $0.4 \times 10^{-3}\%$).

❖ **Fracción 3** (0.729g):

Esta fracción se obtuvo con una mezcla de n-Hex: AcOEt 75:25 y tras realizar otra VLC, una cromatografía de exclusión molecular y un HPLC se obtuvieron los compuestos acetato de majorenolida (**1**) (2.6 mg, $0.81 \times 10^{-3}\%$), acetato de majorinolida (**3**) (1.4 mg, $0.44 \times 10^{-3}\%$), *p*-hidroxi-*cis*-cinamato de persanol (**5**) (3.7 mg, $1.16 \times 10^{-3}\%$),

p-hidroxi-*trans*-cinamato de persanol (**6**) (22.4 mg, $7 \times 10^{-3}\%$), y β -sitosterol (2 mg, $0.62 \times 10^{-3}\%$).

❖ **Fracción 4** (3.304 g):

Se obtuvo de la elución de una mezcla de n-Hexano:AcOEt 50:50. Después de realizar otra VLC se aisló el compuesto majorenolida (**2**) (45.4 mg, $14.2 \times 10^{-3}\%$), a una polaridad de n-Hex:AcOEt 70:30 y mediante sucesivos HPLCs se purificaron los productos majorinolida (**4**) (20.8 mg, $6.5 \times 10^{-3}\%$) y ácido ursólico (1 mg, $0.31 \times 10^{-3}\%$).

❖ **Fracción 5** (1.658 g):

La elución utilizada para obtener esta fracción fue AcOEt al 100%. Después se realizó una cromatografía de vacío (VLC), una CLC y una cromatografía de exclusión molecular para por último purificar mediante HPLC y aislar la anhidrocinnzeylanina (**7**) (4.9 mg, $1.53 \times 10^{-3}\%$).

❖ **Fracción 6 y 7:** continúan en estudio.

Los rendimientos han sido calculados sobre la cantidad de planta seca.

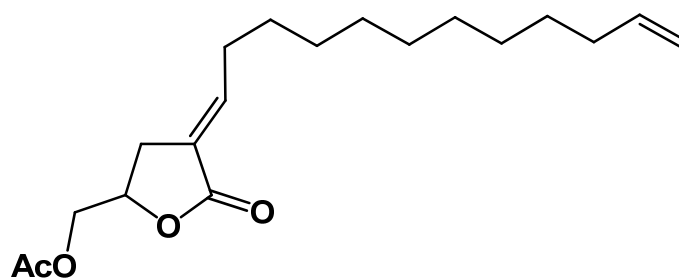
5.1.3. Datos físicos y espectroscópicos de los compuestos aislados

A. Alquil- γ -lactonas

Acetato de majorenolida (**1**)

5-Acetoximetil-(E)-(3-(dodec-11-eniliden) tetrahydrofuran-2-ona.

Los datos espectroscópicos coinciden con los obtenidos por Fraga *et al.* (1996).²⁸

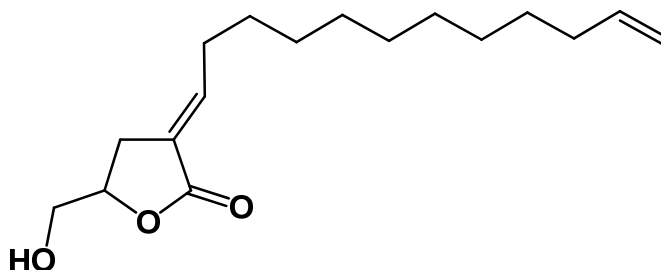


²⁸ Fraga, B.M., Terrero, D. (1996) Alkene- γ -lactones and avocadofurans from *Persea indica*: a revision of the structure of Majorenolide and related lactones. *Phytochemistry*. 41: 229-232.

Majorenolida (2):

(E)-3-(dodec-11-enilidene)-5-(hidroximetil)-tetrahidrofuran-2-ona.

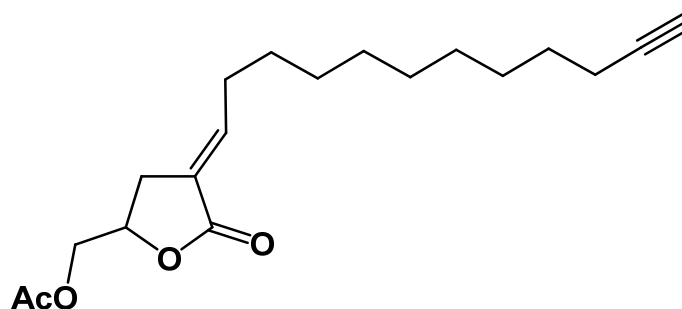
Los datos espectroscópicos coinciden con los publicados por Fraga *et al.*²⁸



Acetato de majorinolida (3):

5-acetoximetil-(E)-3-(dodec-11-enilidene)tetrahidrofuran-2-ona.

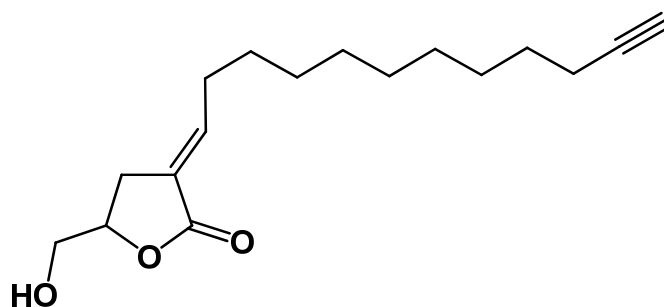
Los datos espectroscópicos son idénticos a los obtenidos por Fraga *et al.*²⁸

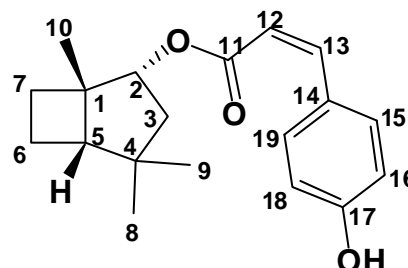


Majorinolida (4):

(E)-3-(dodec-11-enilidene)-5-(hidroximetil)-tetrahidrofuran-2-ona.

Los datos espectroscópicos coinciden con los dados por Fraga *et al.*²⁸

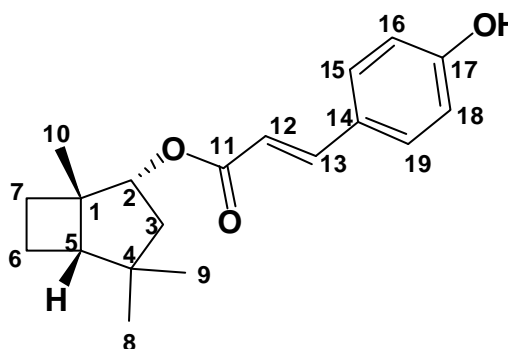


B. Persananos***p*-Hidroxi-*cis*-cinamato de persanol (5):**(Z)-3-(4-hidroxifenil) acrilato de -(1*S*,2*R*,5*S*)-1,4,4-trimetilbiciclo[3.2.0] heptan-2-ilo $[\alpha]_D = -45$ ($c = 0.02$, CHCl_3)

^1H RMN (500 MHz): δ 0.82 y 0.86 (cada uno 3H, s, H-8 y H-9), 0.91 (3H, s, H-10), 1.01 (1H, dd, $J = 13.9, 3.6$ Hz, H-3), 1.21 (1H, m, H-6), 1.27 (1H, m, H-7), 1.67 (1H, t, $J = 4.5$ Hz, H-5), 1.72 (1H, m, H-6), 1.86 (1H, m, H-7), 2.39 (1H, m, H-3), 4.93 (1H, ddd, $J = 10.0, 3.4, 2.4$ Hz, H-2), 5.36 (1H, s ancho, OH), 5.87 (1H, d, $J = 12.8$ Hz, H-12), 6.79 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-16 y H-18), 6.84 (1H, d, $J = 12.8$ Hz, H-13), 7.62 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-15 y H-19).

EM: m/z (int. rel.): 300 $[M]^+$ (9), 164 (4), 153 (4), 148 (15), 147 (100), 121(2), 119 (8).

EMAR: $[M]^+ m/z$ 300.1721. Calculado para $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{O}_3$, 300.1725.

***p*-Hidroxi-*trans*-cinamato de persanol (6):**(E)-3-(4-hidroxifenil) acrilato de (1*S*,2*R*,5*S*)-1,4,4-trimetilbiciclo[3.2.0] heptan-2-ilo $[\alpha]_D = -27.1$ ($c = 0.34$, CHCl_3)

$^1\text{H RMN}$ (500 MHz): δ 0.87 y 0.89 (cada uno 3H, s, H-8 y H-9), 0.92 (3H, s, H-10), 1.06 (1H, dd, $J = 13.6, 3.0$ Hz, H-3), 1.28 (1H, m, H-6), 1.35 (1H, m, H-7), 1.70 (1H, t, $J = 4.5$ Hz, H-5), 1.78 (1H, dc, $J = 4$ Hz, H-6), 2.04 (1H, cd, $J = 4.2$ Hz, H-7), 2.42 (1H, ddt, $J = 13.6, 10.0, 4.1$ Hz, H-3), 5.01 (1H, dt, $J = 10.0, 3.0$ Hz, H-2), 6.33 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-12), 6.57 (1H, s ancho, OH), 6.86 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-16 y H-18), 7.42 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-15 y H-19), 7.62 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-13).

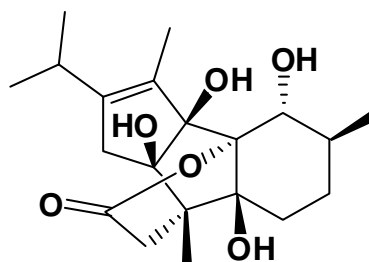
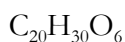
EM: m/z (int. rel.): 300 $[M]^+$ (20), 164 (8), 153 (7), 148 (33), 147 (100), 121(6), 119 (23).

EMAR: $[M]^+ m/z$ 300.1737. Calculado para $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{O}_3$, 300.1725.

C. Ryanodanos

Anhidrocinnzeylanina (7):

Los datos espectroscópicos son idénticos a los publicados por Fraga *et al.*²⁹



Compuestos relacionados estructuralmente

- Ryanodol²³ (8), anhidrocinnzeylanona²⁹ (9), perseanol³⁰ (10), epicinnzeylanol²³ (11): diterpenos polihidroxipentacíclicos aislados de la parte aérea de *Persea indica*.
- Cinnzeylanol (12) y cinnzeylanina (13): diterpenos polihidroxipentacíclicos aislados de la corteza de *Cinnamomum zeylanicum* (Lauraceae)³¹ y de la parte aérea de *P. indica*.

²⁹ Fraga, B.M., Terrero, D., Gutiérrez, C., González-Coloma, A. (2001). Minor diterpenes from *Persea indica*: their antifeedant activity. *Phytochemistry*. 56: 315-320.

³⁰ Fraga, B.M., González-Coloma, A., Gutiérrez, C., Terrero, D. (1997). Insect Antifeedant Isoryanodane Diterpenes from *Persea indica*. *J. Nat. Prod.* 60: 880-883.

5.1.4. Cuantificación de ryanodanos en extractos de hojas, raíces y tallos

Hemos llevado a cabo la cuantificación de ryanodol y cinnzeylanol en extractos de raíz, hojas y tallo de *P. indica*.

Preparación de las muestras

Para facilitar el proceso de cuantificación se han fraccionado ligeramente los extractos, seleccionando únicamente la fracción en la que se encuentren los ryanodanos. Para ello, mediante cartuchos de preparación de muestras de gel de sílica (Varian, 2 cm de largo, 0.9 cm de diámetro) se inyectaron 500 µl de cada extracto disueltos en AcOEtO (1 mg/µl), y se eluyeron a polaridad creciente: AcOEt 100%; AcOEt/MeOH 50%, MeOH 100%.

Una vez obtenidas las fracciones de cada extracto, realizamos un seguimiento mediante cromatografía por capa fina (TLC) para detectar la fracción de cada extracto que contenía ryanodanos. En los tres casos se seleccionó la fracción obtenida con AcOEt 100%

Los patrones **ryanodol (8)** y **cinnzeylanol (9)** se prepararon a una concentración de 10 mg/l en MeOH y las muestras de **hojas, tallos y raíces** seleccionadas a 10 mg/ml en MeOH.

Análisis de las muestras

Se utilizó un cromatógrafo líquido LC-MS, inyectando 5 µl por cada muestra. El método de elución fue un gradiente de H₂O/MeOH de 10 a 60% durante 30 min a un flujo de 1 ml/min. Después se mantuvo en H₂O/MeOH 90% durante 15 minutos.

En cuanto al espectrómetro de masas, la fuente voltaje fue de 4.5 kv y la temperatura del capilar 325°C, con un registro Full Scan en modo negativo ($m/z=50-700$). El calibrado se hizo en modo SIM sobre las m/z 383.3 (cinnzeylanol) y 399.3 (ryanodol).

³¹ Isogai, A., Suzuki, A., Tamura, S., Murakoshi, S., Ohashi, Y., Sasada, Y. (1976). Structures of cinnzeylanine and cinnzeylanol, polyhydroxylated pentacyclic diterpenes from *Cinnamomum zeylanicum* Nees. Agric. Food Chem., 40: 2305-2306.

5.2. *Artemisia absinthium* (L.)

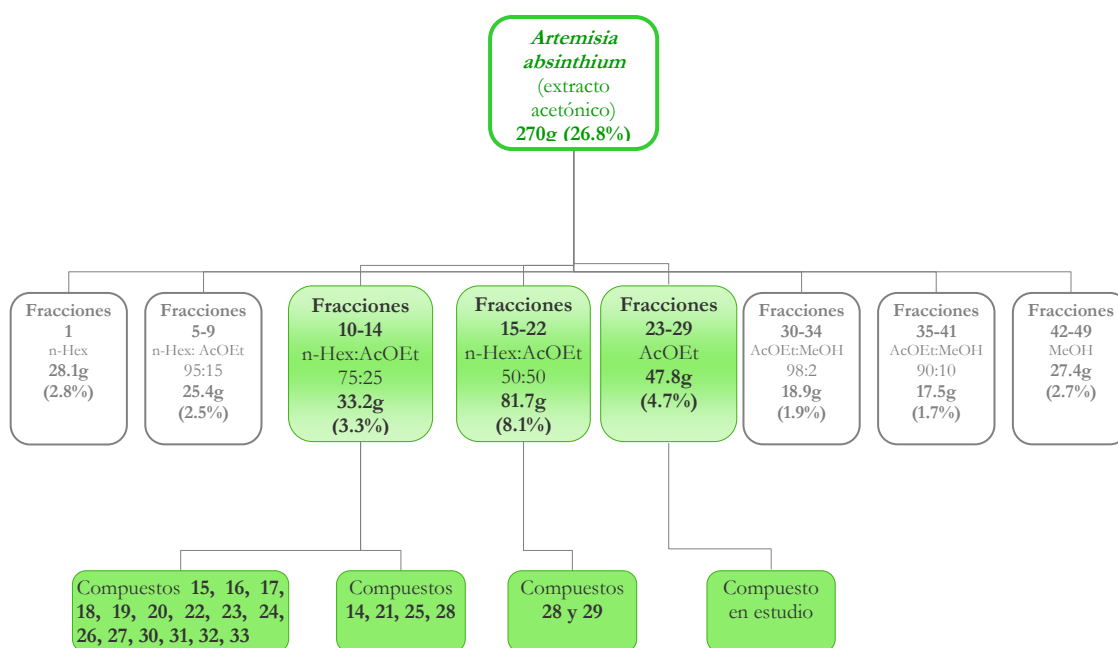
5.2.1. Obtención del extracto crudo



Se llevó a cabo mediante la maceración en frío con acetona de 1006 g de planta seca de *A. absinthium* procedente de la muestra de Ejea del año 2003., obteniéndose 260 g de extracto crudo, lo que supone un rendimiento de 25.84% sobre la cantidad de planta seca.

5.2.2. Fraccionamiento químico biodirigido.

El fraccionamiento comenzó con una columna VLC [21.5cm (alto) x 10cm (diámetro)], partiendo de 260 g de extracto crudo y eluyéndose con un gradiente de polaridad creciente de n-Hex:AcOEt y AcOEt:MeOH, obteniéndose 49 fracciones (esquema 2).



Esquema 2. Fraccionamiento de *A. absinthium*.

Dependiendo de los niveles de actividad frente a diferentes insectos diana se procedió al fraccionamiento guiado por bioensayos, obteniéndose los compuestos puros responsables de la actividad. De las diferentes fracciones sólo se analizaron aquellas con actividad biológica significativa.

Los rendimientos han sido calculados sobre la cantidad de planta seca.

❖ **Fracciones 10-14**(33.2 g, 3.3%): Estas fracciones se obtuvieron con una mezcla de n-Hex:AcOEt 75:25

- Fracción 10-11(19 g, 1.89%): tras realizar una cromatografía líquida de vacío, cromatografía de exclusión molecular, cromatografía en columna de gravedad y HPLC se obtuvieron los compuestos: ácido dehidroabiético (**15**) (1 mg, $0.1 \times 10^{-3}\%$), 24-metilencicloartanol (**16**) (6.7 mg, $0.67 \times 10^{-3}\%$), acetato de 24-metilencicloartanol (**17**) (1 mg, $0.1 \times 10^{-3}\%$), lagerenol (**18**) (6.8 mg, $1.66 \times 10^{-3}\%$), acetato de lagerenol (**19**) (4.9 mg, $0.49 \times 10^{-3}\%$), cicloart-23-Z-ene-3 β -25 diol (**20**) (7.1 mg, $0.7 \times 10^{-3}\%$), cetopelenólido A (**22**) (29.2 mg, $2.9 \times 10^{-3}\%$), cetopelenólido B (**23**) (5.2 mg, $0.52 \times 10^{-3}\%$), dihidrocostunolida (**24**) (3.6 mg, $0.36 \times 10^{-3}\%$), artemol (**26**) (11 mg, $1.09 \times 10^{-3}\%$), espeletona (**27**) (7.7 mg, $0.76 \times 10^{-3}\%$), sieversol (**30**) (73.22 mg, $7.2 \times 10^{-3}\%$), asantina (**31**) (24.8 mg, $2.46 \times 10^{-3}\%$), sesamina (**32**) (13.9 mg, $1.39 \times 10^{-3}\%$), kobusina (**33**) (2.2 mg, $0.22 \times 10^{-3}\%$), cuya estructura se muestra en la tabla. Además se aislaron los fitosteroles β -sitosterol, campesterol y estigmasterol.
- Fracción 13 (3.9 g, 0.39%): una vez realizada una cromatografía de exclusión molecular, una cromatografía líquida de vacío y HPLC se obtuvieron 4 compuestos, la flavona artemetina (**28**) y dos lactonas sesquiterpénicas, hidroxipelenólido (**21**) (494 mg, $49.1 \times 10^{-3}\%$) y absilactona (**25**) (19.5 mg, $1.94 \times 10^{-3}\%$), cuya estructura se muestra en la tabla. De estos tres compuestos aislados, **21** y **28** son mayoritarios en la planta.
- Fracción 14 (4.3 g, 0.43%): tras realizar una cromatografía de exclusión molecular, una cromatografía en columna de gravedad y HPLC se aislaron dos compuestos,

el monoterpeneo (Z)-2,6-dimetilocta-5,7-dien-2,3-diol (**14**) (25.2 mg, $2.5 \times 10^{-3}\%$) así como la artemetina (**28**), compuesto mayoritario de la planta.

❖ **Fracciones 15-22** (81.7 g, 8.12%): Estas fracciones se obtuvieron con una mezcla de n-Hex:AcOEt 50:50

- Fracción 16 (11.3 g, 1.12%): tras realizar una cromatografía de exclusión molecular y una cromatografía en columna de gravedad se aislaron las dos flavonas mayoritarias artemetina (**28**) y casticina (**29**) (131 mg, $13 \times 10^{-3}\%$).

❖ **Fracciones 23-29** (47.8 g, 4.7%): Estas fracciones se obtuvieron con AcOEt (100%).

- Fracción 23-24 (16.4 g, 1.63%): tras realizar una cromatografía de exclusión molecular, una cromatografía en columna de gravedad y HPLC se aisló un compuesto que continúa en estudio (151.2 mg, $15 \times 10^{-3}\%$).

❖ **Fracciones 30-49**: en estudio.

Los productos mayoritarios aislados de la planta han sido los siguientes:

- Hidroxipelenólido (**21**) (494 mg, $48.92 \times 10^{-3}\%$, fracción 13). Este producto ha sido utilizado como sustrato para una biotransformación microbiológica como se detalla en el siguiente capítulo.
- Artemetina (**28**) (214 mg, $21.2 \times 10^{-3}\%$, fracciones 13 y 14): compuesto mayoritario. presente en las fracciones 13-20 de la columna general.
- Casticina (**29**) (131 mg, $13 \times 10^{-3}\%$, fracción 16). Presente en las fracciones 15-22 de la columna general.

Los compuestos **28** y **29** han sido cuantificados por HPLC para obtener la proporción de cada uno en el extracto crudo. Debido a que solo se han estudiado las fracciones más representativas, las cantidades de los productos arriba indicadas no nos permiten obtener el rendimiento total de los productos en la planta.

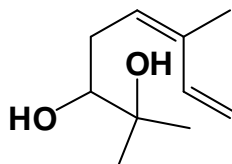
5.2.3. Datos físicos y espectroscópicos de los productos aislados

a) Terpenos

a.1) Monoterpenos

(Z)-2,6-dimetilocta-5,7-dien-2,3-diol (14)

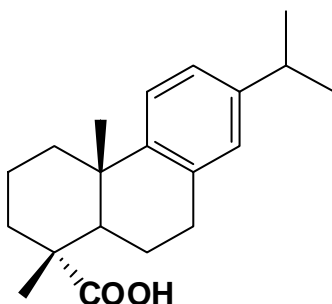
Los datos espectroscópicos coinciden con los publicados por Tsankova *et al.*³²



a.2) Diterpenos

Acido dehidroabiético (15)

Los datos espectroscópicos coinciden con los obtenidos por Chamy *et al.*³³



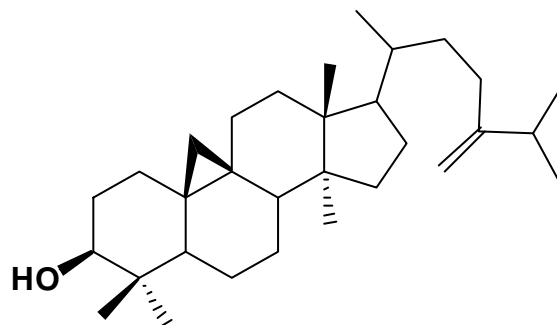
³² Tsankova, E , Bohlmann, F. (1983). A monoterpene from *Aster bakeranus*. Phytochemistry. 22: 1285-1286.

³³ Chamy, M., Piovano, M., Gambaro, V., Nicoletti, G., Nicoletti, M. (1987). Dehydroabietane diterpenoids from *Calceolaria Ascendens*. Phytochemistry. 26: 1763-1765.

a.3. Triterpenos

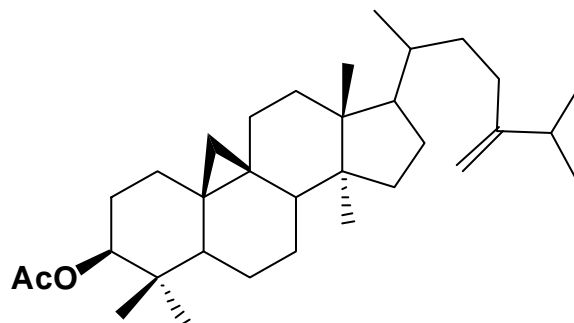
24-Metilencicloartanol (16): 4,4-14- α -trimetil-9 β ,19ciclo-5 α -ergot-24(28)-en-3 β -ol

Los datos espectroscópicos son idénticos a los obtenidos por Öksüz *et al.*³⁴

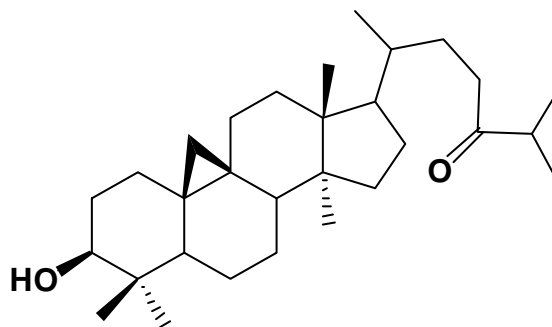
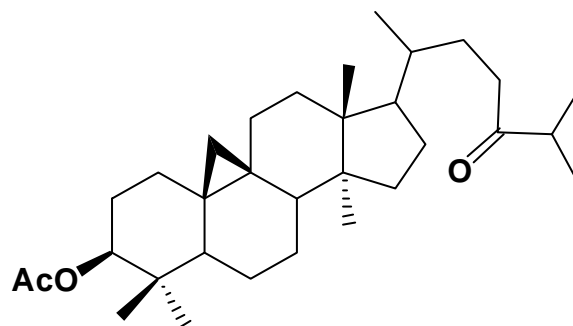


Acetato de 24-metilencicloartanol (17):

Los datos espectroscópicos coinciden con los publicados por Öksüz *et al.*³⁴



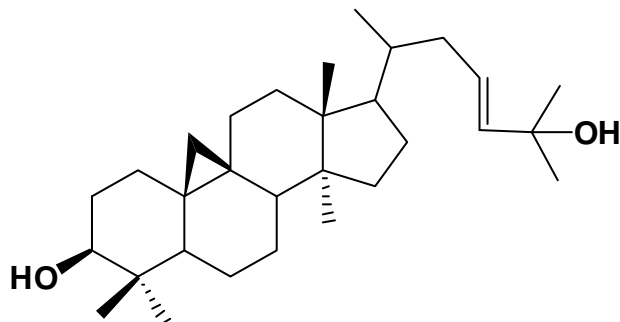
³⁴ Öksüz, S., Ulubelen, A., Barla, A. (2002). Terpenoids and aromatic compounds from *Euphorbia heteradena*. Turk. J. Chem. 26: 457-463.

Lagerenol (18):3 β -hidroxi-cycloartan-24-onaLos datos espectroscópicos coinciden con los obtenidos por Talapatra *et al.*³⁵**Acetato de lagerenol (19):**Los datos espectroscópicos son idénticos a los publicados por Talapatra *et al.*³⁵

³⁵ Talapatra, B., Chaudhuri, P.K., Mallik, A.K., Talapatra, S.K. (1983). Lagerenyl acetate and lagerenol, two tetracyclic triterpenoids with the cycloartane skeleton from *Lagerstroemia lancesteri*. *Phytochemistry*. 22: 2559-2562.

Cicloart-23-Z-ene-3 β -25 diol (20):

Los datos espectroscópicos coinciden con los publicados previamente por Della Greca *et al*³⁶

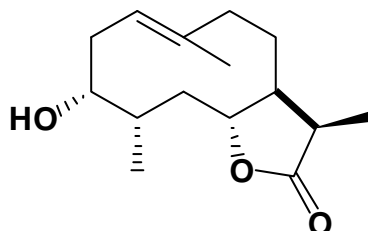


a.4. Sesquiterpenos

Hidroxipelenólido (21):

(3aS,9R,10R,11aR,E)-9-hidroxi-3,6,10-trimetil-3,3a,4,5, 9,10, 11,11a-octahidroci-clodeca[b]furan-2(8H)-ona.

Los datos espectroscópicos son idénticos a los obtenidos por Suchy *et al*.³⁷



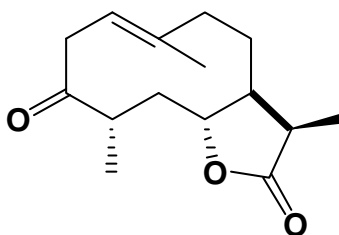
³⁶ Della Greca, M., Fiorentino, A., Monaco, P., Previtera, L. (1994). Cycloartane triterpenes from *Juncus effusus*. *Phytochemistry*.35: 1017-1022.

³⁷ Suchy, M., Samek, Z., Herout, V., Bates, R.B., Snatzke, G., Sorm, F. (1967). On terpenes CLXXXVIII. Constitution and configuration of pelenolides, a new group of sesquiterpene lactone germacranolides. *Coll. Czech. Chem. Commun.* 32: 3917-3925.

Cetopelenólido A (22):

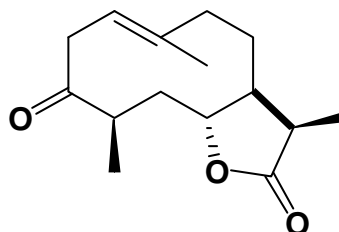
(3R,3aS,10S,11aR,E)-3,6,10-trimetil-3,3a,4,5,11,11a-hexa hidro-ciclodeca[b]furan-2,9(8H,10H)-diona.

Los datos espectroscópicos coinciden con los publicados por Suchy *et al.*³⁷

**Cetopelenólido B (23):**

3R,3aS,10R,11aR,E)-3,6,10-trimetil-3,3a,4,5,11,11a-hexa hidro-ciclodeca[b]furan-2,9(8H,10H)-diona

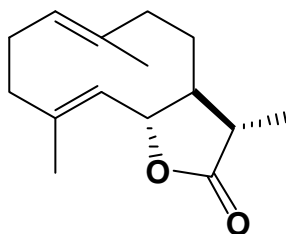
Los datos espectroscópicos son idénticos a los publicados por Wang *et al.*³⁸



Dihidrocostunolida (24):

(3aS,6E,10E,11aS)-3,6,10-trimetil-3,3a,4,5,8,9-hexahidro-ciclodeca[b]furan-2(11aH)-ona

Los datos espectroscópicos coinciden con los publicados por Marco *et al.*³⁹

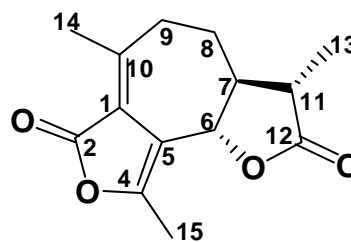


Absilactona (25):

(6aS,9aS,E)-1,4-dimetil-5,6,6a,7,9,9a-hexahidroazuleno[4,5-c]furan-3,8-diona

$[\alpha]_D = -87.6$ (c= 0.29, CHCl₃)

P. f.: 113-115°C, cristalizado en n-Hex/AcOEt



IR: ν max (CCl₄) 3403 (OH), 2931, 2361, 2339, 1773.

¹H RMN (500 MHz): δ 1.25 (3H, d, J= 7 Hz, H-13), 1.65 (1H, m, H-8 β), 1.95 (1H, ddd, J= 10.5, 3.2 Hz, H-7), 2.14 (1H, m, J= 6.1, 3.4 Hz, H-8 α), 2.23 (3H, s, H-15), 2.30 (1H, dd, J= 12.3, 7 Hz, H-11), 2.36 (3H, s, H-14), 2.48 (1H, m, H-9 α), 2.72 (1H, dt, J= 18.5, 5.6 Hz, H-9 β), 4.83 (1H, dd ancho, J= 10.6, 1.6 Hz, H-6).

³⁸ Wang, W.Z., Tan, R.X., Yao, Y.M., Wang, Q., Jiang, F.X. (1994). Sesquiterpene lactones from *Ajania fruticulosa*. *Phytochemistry*. 37: 1347-1349.

³⁹ Marco, J.A., Sanz-Cervera, J.F., Garcia-Lliso, V., Guara, M., Valles-Xiral, J. (1997). Sesquiterpene lactones from *Artemisia inculta*. *Phytochemistry*. 45: 751-754.

EM: m/z (int. rel.): 248 $[M]^+$ (100), 247 (13), 205 (10), 177 (18), 175 (19), 161 (20), 91 (15), 86 (11), 84 (16).

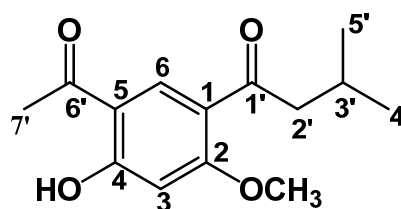
EMAR: $[M]^+ m/z$ 248.1040. Calculado para $C_{14}H_{16}O_4$, 248.1049.

C. Fenoles y flavonas

Artemol (26)

1-(5-acetil-2-hidroxi-4-metoxifenil)-3-metilbutan-1-ona

P.f.: 86-88°C, cristalizado en nHex/AcOEt



1H RMN (500 MHz): δ 0.94 y 0.96 (cada uno 3H, d, $J=6.7$ Hz, H-4' y 5'), 2.21 (1H, m, $J=6.7$ Hz, H-3'), 2.61 (3H, s, H-7'), 2.81 (2H, d, $J=6.8$ Hz, H-2'), 3.94 (3H, s, -OMe), 6.44 (1H, s, H-3), 8.25 (1H, s, H-6), 12.91 (1H, s, -OH).

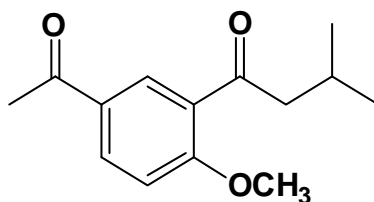
EM: m/z (int.rel.) 250 $[M]^+$ (20), 235 (10), 208 (20), 194 (22), 193 (100), 175 (11)

EMAR: $[M]^+ a m/z$ 250.1201. Calculado para $C_{14}H_{18}O_4$, 250.1205.

Espeletona (27):

1-(5-acetil-2-metoxifenil)-3-metilbutan-1-ona

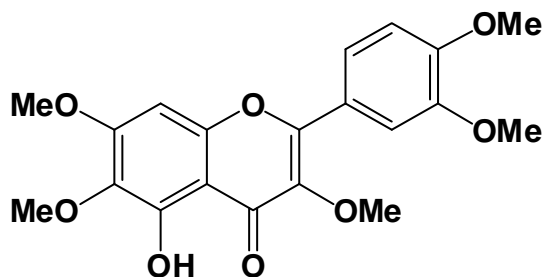
Los datos espectroscópicos coinciden con los publicados por Bohlmann.⁴⁰



Artemetina (28):

5-hidroxi-3,6,7,3',4'-pentametoxiflavona

Los datos espectroscópicos son idénticos a los obtenidos por Rahman *et al.*⁴¹ y Yoshioka *et al.*⁴²



⁴⁰ Bohlmann, F, Rao, N. (1973). Neue hydroxyacetophenon-derivative aus *Espeletia schultzii* Wedd. Chem. Ber. 106, 3035-3038.

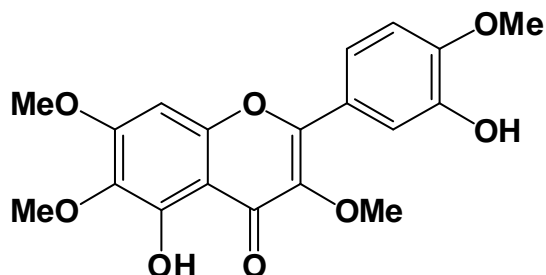
⁴¹ Rahman, A., Ahmed, D., Choudary, M.I. Turkoz, S., Sener B., (1988). Planta Med. 54: 173-174.

⁴² Yoshioka, T., InokuchT., Fujioka, S., Kimura, Y. (2004). Phenolic compounds and flavonoids as plant growth regulators from fruit and leaf of *Vitex rotundifolia*. Z. Naturforsch. 59: 509-514.

Casticina (29):

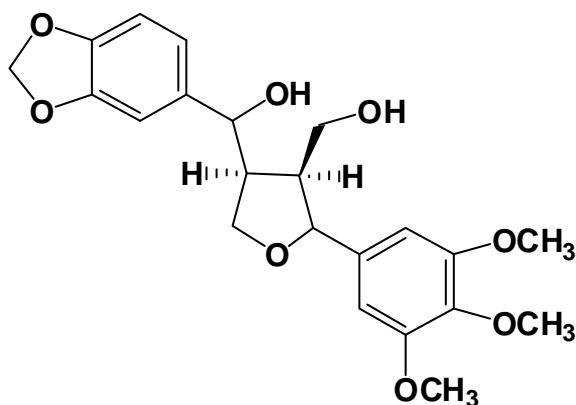
5,3'-hidroxi-3,6,7,4'-tetrametoxiflavona

Los datos espectroscópicos coinciden con los publicados por Asker *et al.*⁴³

**d) Lignan****Sieversol (30)**

(R)-((4R,5S)-5-(benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-4-(hidroximetil)-tetrahidrofuran-3-yl)(3,4,5 tri-metoxifenil) metanol

Los datos espectroscópicos coinciden con los publicados por Tan *et al.*⁴⁴



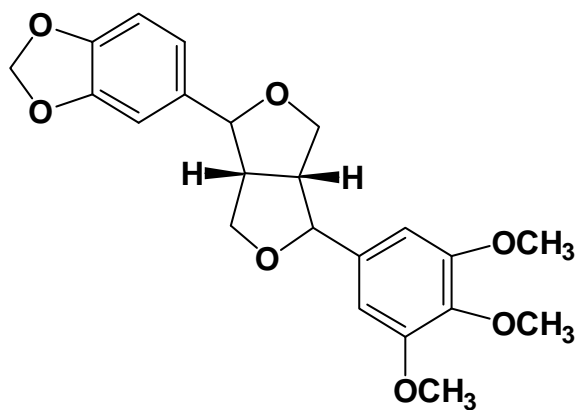
⁴³ Asker, E., Akin, S., Hökelek, T. (2006). 5,3'-diydroxy-3,6,7,4'-tetramethoxyflavone. Acta Cryst. E62, o4159-o4161.

⁴⁴ Tan, R.X., Tang, H.Q., Hu, J., Shuai, B. (1998). Lignans and sesquiterpene lactones from *Artemisia sieversiana* and *Inula racemosa*. Phytochemistry. 49: 157-161.

Asantina (31):

5-((1S,6aR)-4-(3,4,5-trimetoxifenil)-hexahidrofuro[3,4-c]furan-1-il)benzo[d][1,3]dioxol

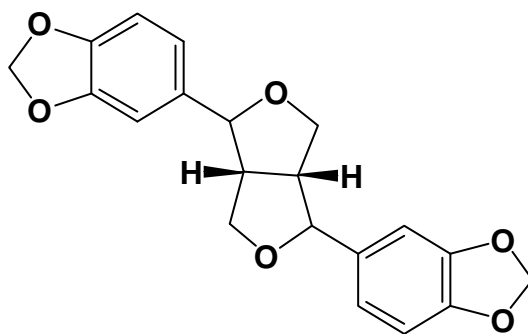
Los datos espectroscópicos son idénticos a los publicados por Enders *et al.*⁴⁵ y Ahmed *et al.*⁴⁶



Sesamina (32):

1,4-di(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-hexahidrofuro[3,4-c]furan

Los datos espectroscópicos coinciden con los obtenidos por Enders *et al.*⁴⁵

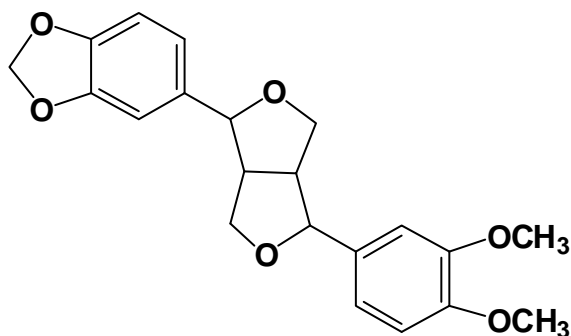


⁴⁵ Enders, D., Lausberg, V., Del Signore, G., Berner, O.M. (2002). A general approach to the asymmetric synthesis of lignans: (-)-methyl piperitol, (-)-sesamin, (-)- aschantin, (+)-yatein, (+)-dihydroclusin, (+)-burseran, and (-)-Isostegane. *Synthesis*, 4: 515-522.

Kobusina (33):

5-(4-(3,4-dimetoxifenil)-hexahidrofuro[3,4-c]furan-1-il)benzo [d][1,3] dioxol

Los datos espectroscópicos son idénticos a los publicados por Takayama *et al.*⁴⁷

**5.2.4. Cuantificación de flavonas en parte aérea y raíces.**

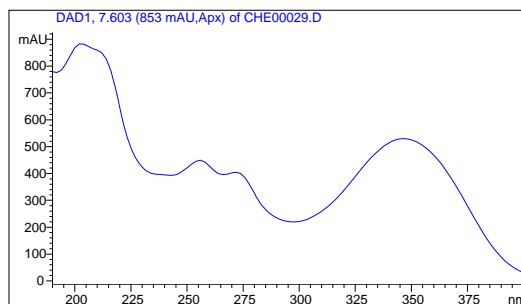
Para la cuantificación de flavonas artemetina (**28**) y casticina (**29**), se realizó la extracción de raíces y parte aérea de *A. absinthium* de la muestra de **SNC07** mediante maceración, a temperatura ambiente y en acetona.

La cromatografía se llevó a cabo con un HPLC-masa. El método de elución fue un gradiente de Acn/ H₂O ácida (H₃PO₄ al 1%) de 50 a 100% durante 10 min a un flujo de 1 ml/min y una temperatura de 25°C. Después se mantuvo acetonitrilo 100% durante 10 minutos más.

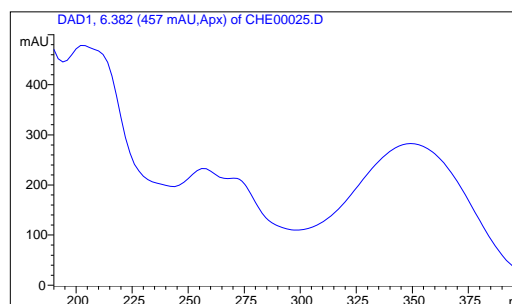
Una vez seleccionado el método de elución se determinaron los máximos de absorción de los compuestos para seleccionar la longitud de onda adecuada para nuestro experimento, que fue de 340 nm para las dos flavonas.

⁴⁶ Ahmed, A.A., Mahmoud, A.A., Ali, E.T., Tzakou, O., Coudalis, M., Mabry, T.J., Gáti, T., Tóth, G., (2002). Two highly oxygenated eudesmanes and 10 lignans from *Achillea holosericea*. *Phytochemistry*, 59: 851-856.

Determinación de los máximos de absorción



Espectro estándar de **artemetina (28)**
(tiempo retención 7.585 min)



Espectro estándar de **casticina (29)**
(tiempo retención 6.384 min)

Se elaboró una curva de calibrado para cada compuesto a cuantificar, procediéndose al análisis de los extractos que mediante la inyección de 20 μ l de una solución a 1 μ g/ μ l en MeOH de cada muestra (raíz y parte aérea).

Resultados y discusión

Resultados y discusión

1. *Persea indica*

Persea indica es una especie relictica y protegida de la flora del terciario, cuyo contenido en diterpenos bioactivos de tipo ryanodol es único en la naturaleza.

Basándonos en el interés de los productos bioactivos aislados de la parte aérea,¹ decidimos proceder al estudio de las raíces de esta especie. *P. indica* es una especie arbórea, por lo que el acceso a las raíces es muy difícil y no renovable. Nosotros abordamos este problema mediante la aplicación de técnicas de cultivo. En primer lugar realizamos el **cultivo *in vitro* de raíces transformadas** procedentes de plántulas germinadas de semillas, mediante la transformación genética con *Agrobacterium rhizogenes*.^{2,3}



Formación de raíces transformadas en tallos de *Persea indica*.

Este procedimiento no dio los resultados esperados, ya que al pasar las raíces transformadas a medio líquido se produjo una inhibición de su crecimiento, lo que hizo imposible la replicación del cultivo, para obtener cantidad de biomasa de raíz suficiente para el estudio.

¹ González-Coloma, A., Cabrera R., Castañera, P., Gutiérrez Fraga, B.M., (1992). Insecticidal Activity and Diterpene Content of *Persea indica*. Phytochemistry. 31, (1), 549-1152.

² Srivastava, S., Srivastava, A. K. (2007). Hairy roots culture for mass-production of high-value secondary metabolites. Crit. Rev. Biotechnol. 27: 29-43.

³ Allan, E.J., Eeswara, J.P., Jarvis, A.P., Mordue (Luntz), A.J., Morgan, E.D., Stuchbury, T. (2002). Induction of hairy root cultures of *Azadirachta indica* A.Juss. and their production of azadirachtin and other important insect bioactive metabolites. Plant. Cell. Rep. 21: 374-379.

Paralelamente se estableció el cultivo aeropónico de esta planta. El cultivo aeropónico permite obtener muestras de planta a lo largo de su ciclo vital sin comprometer su supervivencia, permitiendo al mismo tiempo un control preciso de los nutrientes así como la manipulación de las condiciones de estrés abiótico con el fin de inducir la producción de metabolitos secundarios. Además, la accesibilidad de las raíces permite hacer muestreos selectivos (raíces primarias y secundarias). También es importante destacar el bajo coste de esta técnica y su versatilidad. Además, los cultivos aeropónicos permiten disponer de material vegetal libre de la interferencia de insectos y microorganismos, independientemente de la estación del año, pudiéndose acceder a las raíces sin destruir la planta. Este tipo de cultivos se utilizan en la producción de partes aéreas de plantas comestibles como lechugas, tomates, etc.⁴ La posibilidad de utilizar estas técnicas en la producción de plantas silvestres, de interés en la producción de metabolitos secundarios, es muy prometedora⁵ y está poco explorada.

1.1. Actividad biológica de extractos de raíces, hojas y tallos. Fracciones del extracto crudo de raíces aeropónicas.

Una vez obtenido el extracto etanólico de las raíces del cultivo aeropónico de *P. indica*, se realizaron los bioensayos descritos en el apartado de Material y métodos.

En la tabla 1 se muestra la actividad antialimentaria del extracto de raíces así como la actividad de los extractos obtenidos de la parte aérea (hojas y tallos), frente a diferentes especies de insectos diana.

Tabla 1. Actividad de los extractos etanólicos de raíces y parte aérea frente a diferentes insectos diana (dosis 100 µg/cm²)

Extracto	<i>S. littoralis</i>	<i>R. padi</i>			<i>M. persicae</i>		
	%FR ^a	%SI ^b	%T ^c	%C ^d	%SI ^b	%T ^c	%C ^d
HOJAS	72*± 22	49*	33 ± 27	67 ± 27	17	51 ± 21	49± 21
TALLOS	97*± 5	45*	35 ± 22	65 ± 22	22	50 ± 19	50± 19
RAÍZ	70*± 25	29*	45 ± 20	55 ± 20	22	46 ± 19	54± 19

^aPorcentaje de inhibición de la alimentación; ^bPorcentaje de inhibición del asentamiento; ^cPorcentaje de pulgones asentados en el tratamiento; ^dPorcentaje de pulgones asentados en el control.*Indica diferencias significativas respecto al control (p<0.05).

⁴ Resh, H.M. (1989). Hydroponic Food Production. Woodbridge Press Publishing Co. Santa Barbara, CA.

⁵ Massantini, F. (1977). The light and dark sides of aeroponics. Soilless culture 1, 85-96.

Los extractos de *P. indica* presentan actividad antialimentaria significativa frente a *S. littoralis* con un porcentaje de inhibición superior al 70%, siendo más activo el extracto de tallos (%FR= 97), donde se ha descrito una mayor concentración de diterpenos ryanodanos que en las hojas.^{1,6} Los ryanodanos son los compuestos mayoritarios de tallos y hojas de esta planta y los responsables de la actividad insecticida.⁷ Por otro lado, se puede observar una moderada inhibición del asentamiento de *R. padi* (%SI<50), la cual desaparece en el caso de *M. persicae* con los tres extractos.

No se observaron efectos antiparasitarios frente a *Leishmania infantum* y *Trypanosoma cruzi* o fitotóxicos (*Latuca sativa*) en ninguno de los ensayos realizados (datos no presentados).

Teniendo en cuenta que el extracto de raíz resultó tan activo como el de hojas, se realizó su fraccionamiento guiado por bionesayos.

Tabla 2. Actividad antialimentaria de las fracciones obtenidas de VLC-1 del extracto crudo de raíces aeropónicas de *P. indica* frente a diferentes insectos diana (dosis 100µg/cm²).

FRACCIÓN	<i>S. littoralis</i>	<i>R. padi</i>			<i>M. persicae</i>		
	%FR ^a	%SI ^b	%T ^c	%C ^d	%SI ^b	%T ^c	%C ^d
1 (n-Hex/EtO Ac 100:0)	68* ± 42	25	47 ± 20	53 ± 20	68*	22 ± 22	78 ± 22
2 (n-Hex/EtO Ac 90:10)	29 ± 40	44*	37 ± 22	63 ± 22	66*	23 ± 13	77 ± 13
3 (n-Hex/EtO Ac 75:25)	31 ± 44	36*	47 ± 28	53 ± 28	47*	35 ± 21	65 ± 21
4 (n-Hex/EtO Ac 50:50)	82* ± 30	75*	16 ± 16	84 ± 16	48	39 ± 35	71 ± 35
5 (n-Hex/EtO Ac 0:100)	86* ± 13	57*	28 ± 19	72 ± 19	29	46 ± 20	54 ± 20
6 (EtO Ac/MeOH 98:2)	100* ± 5	28	50 ± 27	50 ± 27	56*	30 ± 21	70 ± 21
7 (EtO Ac/MeOH 0:100)	65* ± 26	24	49 ± 19	51 ± 19	30	45 ± 20	55 ± 20

^aPorcentaje de inhibición de la alimentación; ^bPorcentaje de inhibición del asentamiento; ^cPorcentaje de pulgones asentados en el tratamiento; ^dPorcentaje de pulgones asentados en el control.*Indica diferencias significativas respecto al control (p<0.05).

⁶ González-Coloma, A., Cabrera R., Socorro Monzón, A.R., Fraga, B.M., (1993). *Persea indica* as a Natural Source of the Insecticide Ryanodol. *Phytochemistry*. 34: 397-400.

⁷ González-Coloma, A., Cabrera R., Castañera, P., Gutiérrez Fraga, B.M., (1992). Insecticidal Activity and Diterpene Content of *Persea indica*. *Phytochemistry*. 31: 549-1152.

Como resultado del primer fraccionamiento (VLC-1), obtuvimos 7 fracciones con diferentes niveles de actividad. Podemos destacar la elevada actividad antialimentaria frente a *S. littoralis* de las fracciones 4, 5 y 6 (FR%>70), mientras que en las fracciones 1 y 7 la actividad es moderada y nula en la 2 y la 3. En el caso de los áfidos la actividad más elevada la presentaron las fracciones 4 y 5 frente *R. padi*, y 1, 2 y 6 frente a *M. persicae*.

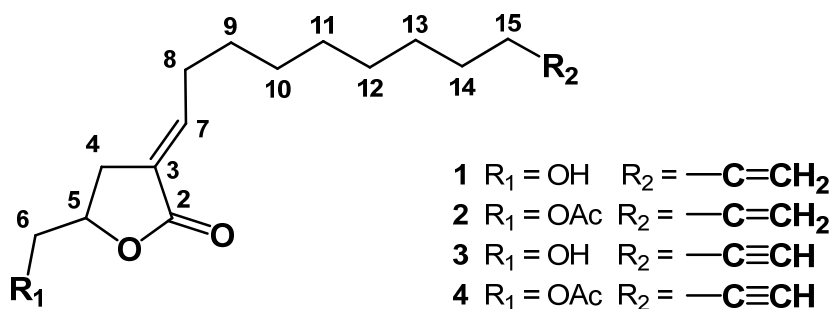
1.2. Compuestos resultantes del fraccionamiento biodirigido.

El fraccionamiento sucesivo de esas fracciones nos permitió aislar una serie de compuestos que se pueden agrupar según su estructura química en:

- alquil- γ -lactonas
- persananos
- ryanodanos

1.2.1. Alquil- γ -lactonas

De las fracciones 3 y 4 obtenidas del primer fraccionamiento del extracto crudo de raíces de *P. indica* y tras utilizar diferentes técnicas cromatográficas, se aislaron 4 alquil- γ -lactonas (**1**, **2**, **3**, y **4**).



El compuesto **2** se aisló anteriormente de tallos y hojas de *P. indica*.⁸ Esta lactona coincide con la estructura del compuesto denominado majorenolida, aislado de la

⁸ Fraga, B.M., Terrero, D. (1996). Alkene- γ -lactones and avocadofurans from *Persea indica*: a revision of the structure of Majorenolide and related lactones. *Phytochemistry*, 41, (1), 229-232.

corteza de *P. major*,⁹ teniendo en cuenta la revisión de la estructura propuesta por Fraga *et. al* (1996).⁸ Además, el compuesto **4** correspondería con la lactona majorinolida, que también ha sido aislada de la corteza de *P. major*.⁹ Estos compuestos forman un par de lactonas alqueno-alquino terminal. Los compuestos **1** y **3** no se han aislado anteriormente en la naturaleza, aunque si se han obtenido por vía sintética, mediante la acetilación de los compuestos **2** y **4**.⁸

Tabla 3. Ensayos de actividad leishmanicida, tripanocida y citotoxicidad sobre células de mamífero (CHO) expresados como ED₅₀ (µg/ml).

Compuesto	CHO	<i>L. infantum</i>	<i>T. cruzi</i>
1	2.6 (1.4, 4.7)	≈100	>100
2	10.15 (6.9, 14.7)	8.3 (6.7, 10.4)	13.5 (11.8, 15.4)
3	>100	25.6 (20.4, 32)	50 (43, 58.2)
4	3.14 (2.4, 4.2)	35.8 (21.4, 59.7)	> 100

ED₅₀: dosis capaz de producir un 50% de actividad.

Los productos **2** y **3** han presentado elevada actividad frente a los dos parásitos, *L. infantum* y *T. cruzi*, siendo más elevada en el caso del producto **2** con ambos parásitos (ED₅₀=8.3 y 13.5 µg/ml respectivamente, tabla 3). Este producto produjo efectos citotóxicos sobre la línea de células de mamífero CHO (ED₅₀=10.15 µg/ml), lo que puede indicar que la toxicidad que produce es de tipo inespecífico. De forma similar, el producto **4** presentó una moderada actividad leishmanicida (ED₅₀=35.8 µg/ml) y una toxicidad bastante alta con células de mamífero (ED₅₀=3.14 µg/ml).

Las alquil-γ-lactonas ensayadas se pueden ordenar según su actividad leishmanicida de la siguiente forma: **2>3>4**. Los productos **1** y **4** no presentaron actividad tripanocida (ED₅₀>100 µg/ml), sin embargo fueron los productos con mayor citotoxicidad sobre células CHO (ED₅₀=2.6 y 3.14 µg/ml, respectivamente).

⁹ Ma, W.W., Anderson, J.E., Chang, C.J., Smith, D.L., McLaughlin, J.L.(1989) Majorenolide and Majorynolide: A new pair of cytotoxic and pesticidal alkene-alkyne-δ-lactones from *Persea major*. J. Nat. Prod. 52: 1263-1266.

Tabla 4. Efectos tóxicos de las alquil- γ -lactonas sobre *S. littoralis* (canulación oral, 40 μg /larva) y ensayos de citotoxicidad con células de *S. frugiperda* (ED_{50} $\mu\text{g}/\text{ml}$).

Compuesto	Citotoxicidad <i>S. littoralis</i>		
	Sf9 ^a	ΔB^b	ΔI^c
1	26.5 (15.6, 49)	93	95
2	17.3 (12, 24.8)	87	88
3	>100	83	80
4	11.5 (6.4, 20.8)	53* $p_{\text{ANCOVA}2}=0.0001$	59*

*Indica diferencias significativas respecto al control ($p<0.05$).^aCélulas de ovario de pupa de *Spodoptera frugiperda*. ^bCrecimiento relativo expresado con % del control (ΔB =variación del peso del insecto en mg). ^cConsumo relativo expresado como % del control (ΔI = mg de alimento consumido).

Las alquil- γ -lactonas que han resultado ser citotóxicas con células de insecto (Sf9) también lo han sido con las células de mamífero (CHO, tabla 3) siendo su nivel de actividad con Sf9: **4>2>1**, mientras que el compuesto **3** no es citotóxico con células de insecto ($\text{ED}_{50}\geq 100$ $\mu\text{g}/\text{ml}$) ni de mamífero.

Ningún producto de este grupo ha presentado actividad antialimentaria ni toxicidad postingestiva con la excepción del compuesto **4** (tabla 4). Este compuesto ha reducido significativamente la ingesta de alimento (ANCOVA 1, $p>0.05$), produciéndose además efectos tóxicos postingestivos (ANCOVA 2, $p=0.0001$), lo que sugiere un efecto tóxico además del digestivo. Hay que destacar que además ha resultado ser el más citotóxico con células de insecto. Sin embargo, los productos **1** y **2** son citotóxicos con Sf9 pero no tienen actividad antialimentaria ni toxicidad postingestiva con *S. littoralis*.

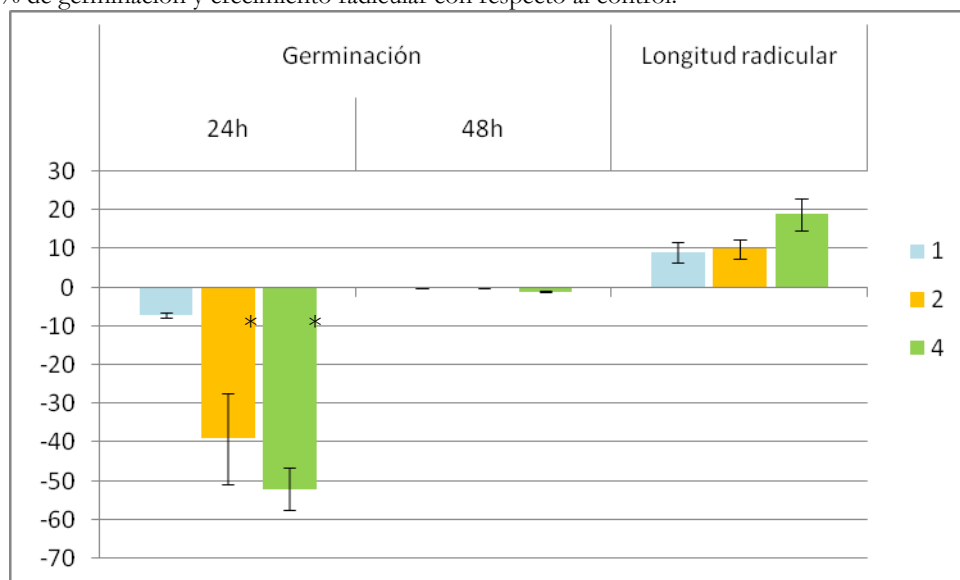
Tabla 5. Actividad antialimentaria de alquil- γ -lactonas frente a diversos insectos diana (dosis 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$)

Compuesto	<i>R. padi</i>			<i>M. persicae</i>			<i>S. littoralis</i>
	%SI ^a /EC ₅₀	%T ^b	%C ^c	%SI ^a /EC ₅₀	%T ^b	%C ^c	%FR ^d
1	ne	ne	ne	ne	ne	ne	22 \pm 34
2	70* 17.64 (8.9, 35)	20 \pm 20	80 \pm 20	66* 15.8 (8.2, 30.4)	22 \pm 18	78 \pm 18	24 \pm 35
3	ne	ne	ne	41	38 \pm 22	62 \pm 22	48 \pm 44
4	46	37 \pm 27	63 \pm 27	40	37 \pm 23	63 \pm 23	43* \pm 22

^aPorcentaje de inhibición del asentamiento; ^bPorcentaje de pulgones asentados en el tratamiento; ^cPorcentaje de pulgones asentados en el control; ^dPorcentaje de inhibición de la alimentación; *Indica diferencias significativas respecto al control ($p<0.05$). EC₅₀: dosis capaz de producir un 50% de actividad expresado en $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. ne: no se realizó el ensayo.

El único compuesto que ha producido una inhibición de la alimentación significativa con áfidos ($p < 0.05$) ha sido la alqueno lactona **2**, siendo activo con las dos especies utilizadas *R. padi* y *M. persicae*, con unos valores de EC_{50} de 17.64 y 15.8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ respectivamente (tabla 5). Los valores obtenidos frente a *M. persicae* son similares a los obtenidos con el farnesol ($EC_{50} = 14.9$ (12.1, 18.3) $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), sesquiterpeno de conocida actividad pesticida frente a pulgones, mientras que el caso de *R. padi* son 10 veces superiores ($EC_{50} = 1.7$ (1.2, 2.6) $\mu\text{g}/\text{cm}^2$).¹⁰ En cuanto al ensayo realizado con larvas de *S. littoralis*, ninguno de los productos mostró actividad antialimentaria, con la excepción del compuesto **4** (majorinolida) que produjo un efecto moderado o leve (%FR=43, $p < 0.05$).

Gráfica 1. Efectos fitotóxicos en semillas de *Latuca sativa* (dosis 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), expresados como % de germinación y crecimiento radicular con respecto al control.



*Indica diferencias significativas respecto al control ($p < 0.05$).

Los efectos antigerminativos a las 24 horas, en el ensayo con semillas de *L. sativa*, se han producido con aquellas lactonas con un OH en la posición 6, concretamente majorenolida (**2**) y majorinolida (**4**), siendo mayores los efectos

¹⁰ González-Coloma, A., Valencia, F., Martín, N., Hoffmann, J.J., Hutter, L., Marco, J.A., Reina, M. (2002). Silphinene sesquiterpenes as model insect antifeedants. J.Chem. Ecol. 28, 117-129.

producidos por **4** (48% de germinación respecto del control). En cuanto a la longitud radicular, los efectos obtenidos no fueron significativos (gráfica 1).

Las alquil lactonas son compuestos bastante comunes en la familia de las Lauráceas y poseen diversas actividades biológicas, principalmente citotóxicas. En *P. major* se han identificado tres lactonas conocidas: majorinolida, majorenolida y majoranolida, con propiedades citotóxicas frente a varias líneas tumorales e insecticidas.^{9,11} La actividad citotóxica de majorenolida con líneas tumorales es del orden de dos o tres veces mayor que la de majorinolida,⁹ lo cual ocurre también en los ensayos que hemos realizado con parásitos (*T. cruzi* y *L. infantum*).

En *Litsea japonica* se han aislado seis compuestos denominados litsenolides, con estructura γ -lactona unida a una cadena lateral de tipo alqueno o alquino (pares de compuestos lactónicos alqueno-alquino terminales), con actividad citotóxica en líneas tumorales^{12,13} y actividad anti-VIH.¹⁴ También se han aislado este tipo de pares de compuestos en mas plantas de la misma familia como rubrenolida y rubrinolida aislados de *Nectandra rubra*,¹⁵ mahubenolidas y mahubinolidas aisladas de *Clinostemon mahuba*¹⁶. Otro compuesto de estructura similar es la obtusilactona que se encuentra en las hojas de la planta *Lindera obtusiloba*¹⁷ y tiene actividad citotóxica.¹⁸ Además se han aislado otros butanolides en esta misma planta con actividad citotóxica antitumoral.¹⁹

¹¹ Ma, W., Anderson, J.E., Chang, C.J., Smith, D.L., Mclaughlin, J.L. (1990). Majoranolide: A δ -lactone from *Persea major*. Phytochemistry 29: 2698-2699

¹² Takeda, K., Sakurawi, K., Ishii, H. (1972). Components of the Laureaceae Family-I. New Lactonic Compounds from *Listea japonica*. Tetrahedron. 28: 3757-3766.

¹³ Chen, I-S., Lai-Yaun, I-L., Duh, C-Y., Tsai, I-L. (1998). Cytotoxic butenolides from *Litsea akoensis*. Phytochemistry, 49: 745-750.

¹⁴ Zhang, H-J., Hung, N.V., Cuong, N.M., Soejarto, D.D. *et al.* (2005) Sesquiterpenes and Butenolides, Natural Anti-HIV Constituents from *Litsea verticillata*. Planta Med. 71: 452-457.

¹⁵ Franca, N.C., Gottlieb, O.R., Coxon, D.T. (1977). Rubrenolide and Rubrynolide: an Alkene-alkyne pair from *Nectandra rubra*. Phytochemistry, 16: 257-262.

¹⁶ Martinez, J.C., Yoshida, M., Gottlieb, O.R. (1981) ω -ethyl, ω -ethenyl and ω -ethynyl- α -alkylidene- γ -lactones from *Clinostemon mahuba*. (1981) Phytochemistry, 20: 459-464.

¹⁷ Niwa, M., Iguchi, M., Yamamura, S. (1975). The isolation and structure of obtusilactone. Tetrahedron Lett., 19: 1539-1542.

¹⁸ Pettus, J.A., Wing, R.M., Sims, (1977) Tetrahedron Lett., 41.

¹⁹ Kwon, H.C., Baek, N.I., Choi, S.U., Lee, K.R. (2000) New cytotoxic butanolides from *Lindera obtusiloba*. Chem. Pharm. Bull., 48: 614-616.

Entre otros también se puede destacar las butanolidas citotóxicas aisladas de *Litsea akoensis*,¹³ las butenolidas aisladas de *Litsea verticillata* con actividad antivírica frente al VIH²⁰ y las butenolactonas aisladas de *Litsea rotundifolia*, rotundiolides A y B, que son inhibidores enzimáticos.²¹

Por otro lado también hay que destacar la similitud estructural de estos compuestos con los avocadofuranos y tetrahidroavocadofuranos, que presentan actividad insecticida sobre larvas de *Spodoptera exigua*.^{22,23} Los avocadofuranos son compuestos que presentan un anillo de furano en su estructura y han sido aislados de *Persea americana*,²⁴ *Elodea canadensis*,²⁵ y *P. indica*,⁸ así como de otras especies del género *Persea*²⁶, aunque sus efectos tóxicos así como su modo de acción siguen siendo objeto de estudio.

Estos han sido los primeros ensayos antiparasitarios de los alquil derivados aislados de *P. indica*. De ellos cabe destacar que la actividad antiparasitaria aumenta cuando disminuye el grado de instauración de la cadena lateral, es decir, que el grupo etileno potencia la actividad más que el grupo acetileno, hecho que ocurre en los ensayos de citotoxicidad de compuestos con líneas de células tumorales.^{9,11} Además la presencia de un grupo acetato en la posición 6 anula la actividad cuando la cadena lateral termina en un grupo etileno.

²⁰ Zhang, H.J., Van Hung, N., Cuong, N.M., Soejarto, D.D., Pezzuto, J.M., Fong, H.H.s., Tan, G.T. (2005) Sesquiterpenes and butenolides, natural anti-HIV constituents from *Litsea verticillata*. *Planta med.*, 71: 452-457.

²¹ Zhao, Y., Guo, Y.-W., Zhang, W. (2005) Rotundifolides A and B, two new enol-derived butenolactones from the bark of *Litsea rotundifolia* var. *oblongifolia*. *Helv. Chim. Acta.* 88: 349-353.

²² Rodríguez-Saona, C.R., Mayard, D.F., Phillips, S., Trumble, J.T. (1999) Alkylfurans: Effects of Alkyl Side-Chain Length on Insecticidal Activity. *J.Nat.Prod.* 62: 191-193.

²³ Rodríguez-Saona, C.R., Mayard, D.F., Phillips, S., Trumble, J.T. (2000) Avocadofurans and their Tetrahydrofuran Analogues: Comparison of Growth Inhibitory and Insecticidal Activity. *J.Agric. Food Chem.* 48, 3642-3645.

²⁴ Malghaes Aves, H., Coxon, D.T., Falshaw, C.P., Gotfredsen, W.O., Ollis, W.D. (1970) *An. Acad. Brasil Cienc.* 42, 45.

²⁵ Previtera, L., Merola, D., Monaco, P. (1985) Acetogenins from the aquatic plant *Elodea canadensis* *Phytochemistry*, 24, 1838.

²⁶ Rodríguez-Saona, C., Maynard, D.F., Phillips, S., Trumble, J.T. (2000) Avocadofurans and their Tetrahydrofuran Analogues: Comparison of Growth Inhibitory and Insecticidal Activity. *J. Agric. Food Chem.* 48: 3642-3645.

Respecto a *T. cruzi*, el patrón de actividad es similar aunque la sensibilidad a estos productos es menor que en el caso de *Leishmania*. Parece ser que la actividad antiparasitaria puede venir determinada por un equilibrio entre la polaridad de la alquil lactona y la cadena lateral.

Por otro lado, la citotoxicidad con CHO no sigue el mismo patrón de actividad, lo cual puede ser debido a las diferencias de la membrana de estas células y los protozoos parásitos utilizados.

Así mismo, la citotoxicidad observada con células Sf9 tampoco concuerda con los resultados obtenidos con células de mamífero. En este caso la presencia de un anillo en posición 6 potencia la actividad citotóxica, así como la presencia del acetileno en la cadena lateral. Este fenómeno es más acusado en larvas de *S. littoralis*, donde sólo el compuesto **4** (el más activo con Sf9) mantiene la actividad tóxica postingestiva y un moderado-bajo efecto antialimentario. La diferente toxicidad de estos compuestos puede ser debida a la detoxificación y/o excreción de los mismos en el sistema digestivo de *S. littoralis*, lo que le permitiría evadir los efectos citotóxicos.

En el caso de los ensayos con áfidos, la actividad fue exclusivamente del compuesto **2** (majorenolida), lo cual concuerda con los ensayos realizados por Ma *et al.*⁹ en los que se observa una mayor actividad insecticida de este compuesto sobre su análogo majorinolida con áfidos de melón (*Aphis gossypii*). La actividad repelente y antialimentaria con áfidos de las alquil lactonas estudiadas, parece que se potencia con la presencia de un OH en posición 6 y un etileno en la cadena lateral de la lactona.

Esta serie de compuestos tienen una similitud estructural con las acetogeninas, potentes inhibidores del transporte electrónico mitocondrial tanto en mamíferos como en insectos,²⁷ con una amplia variedad de actividades biológicas entre las que se encuentran actividades citotóxica, insecticida y antialimentaria.²⁸ El mecanismo de acción de estas lactonas podría ser similar al de las acetogeninas, que se introducen en la

²⁷ Londershausen, M, Leicht, W., Lieb, F., Moeschler, H., Weiss, H. (1991). Molecular mode of action of annonins. Pestic. Sci. 33, 427-438.

²⁸ Cavé, A., Figadere, B., Laurens, A., Cortes, D. (1997) Acetogenins from Annonaceae. Prog. Ch. Org. Nat. Prod. 70: 81-287.

bicapa lipídica de la membranas celulares, donde la γ -lactona interacciona con el receptor proteico.²⁹ También existe una similitud estructural entre las alquil lactonas y el octil galato debido a la estructura cabeza (lactona)-cola (grupo alquilo). El octil galato es un compuesto fungicida que actúa sobre las membranas celulares gracias a sus propiedades surfactantes.³⁰

Majorenolida y majorinolida son los compuestos mayoritarios de las raíces y los que han presentado una mayor toxicidad en todos los ensayos realizados. En cuanto a la actividad insecticida, hemos observado que pequeños cambios estructurales tienen como resultado diferencias drásticas en la actividad antialimentaria, lo que sugiere una alta selectividad molecular en la quimiorrecepción del gusto de los insectos. La posición de un OH en 6 y un grupo acetileno o etileno en la cadena lateral son los factores que afectan a la actividad de estos compuestos.

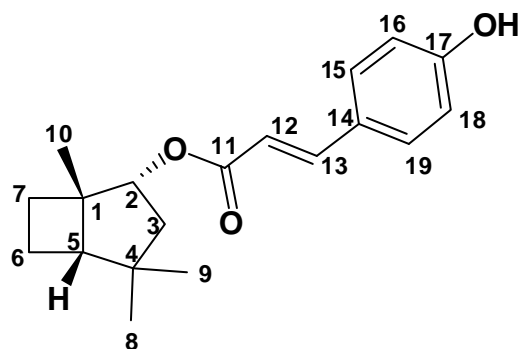
Con los resultados obtenidos pensamos que el mejor candidato para diseñar compuestos antiparasitarios más efectivos (tanto *in vivo* como *in vitro*) es el compuesto **3**, porque aunque su ED₅₀ no es menor que la de los fármacos de referencia (anfotericina B: ED₅₀=B 0.035 µg/ml, nifurtimox: ED₅₀= 2,3 µg/ml, compuesto **3**: ED₅₀=25.6 y 50 µg/ml, *L. infantum* y *T. cruzi* respectivamente), no presenta efectos citotóxicos, lo que supone una propiedad interesante, ya que los tratamientos habituales presentan una gran cantidad de efectos secundarios.

1.2.2. Persananos

Mediante diferentes técnicas cromatográficas guiadas por bioensayos y partiendo de la fracción 3 de la primera cromatografía (VLC) del extracto crudo de raíces de *P. indica*, se aislaron 2 productos, que hemos denominado persananos **5** y **6**.

²⁹ Feras Q., Alali, X. L., McLaughlin, J.L. (1999) Annonaceous Acetogenins: Recent Progress. J. Nat. Prod., 62: 504-540.

³⁰ Fujita, K., Kubo, I. (2002). Antifungal activity of octyl gallate. Int. J. Food Microbiol. 79: 193-201.

***p*-Hidroxi-*cis*-cinamato de persanol (5)**

La estructura relativa dada al compuesto **5** se ha basado en las siguientes consideraciones: Su espectro de masas de alta resolución mostró el ión molecular a 300.1721 m/z , indicando una fórmula de $C_{19}H_{24}O_3$. En su espectro de protón aparecen las señales del protón geminal al grupo éster que resuena a 4.93 δ , y las de los tres grupos metilos angulares. Dos de éstos, que resuenan a 0.87 y 0.89 δ , deben ser geminales, pues en el experimento HMBC de RMN bidimensional los hidrógenos de cada uno de ambos metilos muestran correlaciones con el carbono del otro, así como con el carbono cuaternario que los une. En este mismo experimento se observó conectividad entre el otro metilo angular a 0.91 δ y el C-2, el carbono que porta la función oxigenada, y también con el C-7 metileno. Otras correlaciones que se observaron en este espectro fueron las del protón geminal al grupo éster, es decir H-2 con C-7, C-5, C-3 y C-10; H-3 con C-2 y C-4; H-5 con C-2 y C-4; H-6 con C-7; H-7 con C-1 y C-2; C-11 con H-13 y C-13 con H-15 y H-19.

La β -estereoquímica del grupo éster se asignó considerando el efecto noe observado entre el metilo angular en C-1 y el hidrógeno geminal a dicho éster en C-2.

El grupo éster lo identificamos como el *cis-p*-hidroxi-cinnamato pues en el espectro de RMN de 1H aparecen las señales correspondientes a los hidrógenos aromáticos como un par de dobletes en *orto* que resuenan a 6.79 y 7.62 δ ($J = 8.8$ Hz) de intensidad dos protones cada uno. Los correspondientes carbonos resuenan a 115.9 y 130.0 ppm, respectivamente. Los hidrógenos del doble enlace resuenan a 5.87 y 6.84 δ ,

con una constante de acoplamiento de 12.8 Hz, lo que indicó que el éster se corresponde con el isómero *cis* (E). Los correspondientes carbonos resuenan a 117.8 y 142.2 δ , respectivamente, mientras el carbonilo del grupo éster lo hace a 167.0 ppm.

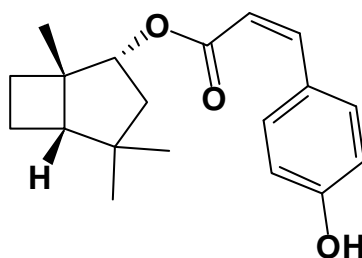
Hemos denominado a este producto como *p*-hidroxi-*cis*-cinnamato de persanol (5). Se trata de un nuevo producto natural donde la parte alcohólica del éster lo constituye un monoterpeno con un nuevo esqueleto, que es la primera vez que se encuentra en la naturaleza. Sintéticamente se había obtenido por fotólisis de Δ^2 -careno, por un reagrupamiento vinilciclopropano-ciclopenteno.³¹

Tabla 6. Datos de ^{13}C - RMN de los compuestos 5 y 6.

carbono	5	6	carbono	5	6
1	47.7	47.8	11	167.0	168.4
2	79.9	80.2	12	117.8	115.7
3	36.7	36.8	13	142.9	144.5
4	48.7	48.9	14	127.6	126.9
5	44.9	45	15	132.2	130.0
6	28.0	28.0	16	114.9	115.9
7	27.0	27.2	17	156.5	158.2
8	18.8 ^a	18.8 ^b	18	114.9	115.9
9	19.6 ^a	19.7 ^b	19	132.2	130.0
10	13.5	13.5			

^{a,b} Estos valores pueden ser intercambiados.

³¹ Sonawane, H.R., Naik, V.G., Bellur., N.S., Shah, V.G., Purohit, P.C. *et al.* (1991). Photoinduced vinylcyclopropane-cyclopentene rearrangement: A methodology for chiral bicyclo[3.2.0]heptenes. Formal syntheses of (\pm)-grandisol and naturally occurring (-)- Δ (9(12))-capnellene and its antipode. Tetrahedron. 47, 8259-8276.

***p*-Hidroxí-*trans*-cinamato de persanol (6)**

El espectro de masas de alta resolución del compuesto **6** mostró el ión molecular a 300.1737 m/z , indicando una fórmula de $C_{19}H_{24}O_3$. Por lo tanto es un isómero del producto anterior **5**. Sus espectro de 1H y ^{13}C RMN son muy similares. La principal diferencia entre ellos se observa en los hidrógenos vinílicos, H-12 y H-13, del grupo éster que ahora, en este producto **6**, resuenan a 6.33 y 6.86 δ , con una constante de acoplamiento de 16 Hz, lo que indica que debe tener la configuración *trans* (*Z*). Las resonancias de los correspondientes carbonos aparecen a 115.7 y 144.5 δ , respectivamente. Como en el caso anterior los espectros de RMN bidimensionales (COSY, NOESY, HSQC y HMBC) permitieron asignar de forma inambigua los espectros de 1H y ^{13}C NMR de este compuesto, y por tanto confirmando su estructura molecular como el *p*-hidroxí-*trans*-cinamato de persanol (**6**). Se trata, como el producto anterior, de un nuevo compuesto natural.

A continuación se presentan los resultados de los ensayos de actividad biológica de los persananos.

Tabla 7. Ensayos de actividad leishmanicida y tripanocida y citotoxicidad sobre células de mamífero (CHO) expresados como ED_{50} ($\mu g/ml$).

Compuesto	CHO	<i>L. infantum</i>	<i>T. cruzi</i>
5	1.49 (1, 2.2)	ne	ne
6	3.8 (3.2, 4.5)	10.8 (8.3, 14)	8.8 (5.5, 13.9)

ED₅₀: dosis capaz de producir un 50% de actividad. **ne:** no se realizó el ensayo

Los perseananos han resultado ser citotóxicos con células de mamífero de la línea CHO (ED₅₀ de 1.49 y 3.8 µg/ml respectivamente), con una actividad del compuesto **5** dos veces mayor que la del compuesto **6** (tabla 7). En cuanto a la actividad antiparasitaria hay que destacar que la actividad del compuesto **6** ha sido elevada, tanto en el caso de *Leishmania* como con *Trypanosoma*, como se puede observar según los valores de ED₅₀ de 10.8 y 8.8 µg/ml respectivamente. La alta actividad sobre células CHO parece indicar una toxicidad de tipo inespecífico.

Tabla 8. Efectos tóxicos de los persananos sobre *S. littoralis* (canulación oral, 40 µg/larva) y ensayos de citotoxicidad con células de *S. frugiperda* (ED₅₀ µg/ml).

Compuesto	Citotoxicidad	<i>S. littoralis</i>	
	Sf9 ^a	ΔB ^b	ΔI ^c
5	11.5 (4.9, 26.8)	55* pANCOVA2=0.12	66*
6	9.4 (6.1, 14.5)	85	79

*Indica diferencias significativas respecto al control (p<0.05).^aCélulas de ovario de pupa de *S. frugiperda*. ^bCrecimiento relativo expresado como % del control (ΔB=variación del peso del insecto en mg). ^cConsumo relativo expresado como % del control (ΔI= mg de alimento consumido).

Tanto el compuesto **5** como el **6** han resultado ser citotóxicos con células de insecto (Sf9) con una ED₅₀ de 11.5 y 9.4 µg/ml respectivamente, mientras que con larvas de *S. littoralis*, sólo el compuesto **5** ha resultado ser activo (tabla 8). En este caso, las larvas de *Spodoptera* tuvieron efectos antialimentarios como consecuencia de la ingestión del compuesto, produciéndose una disminución significativa del peso de la larva (ΔB=55%) así como de la ingesta (ΔI=66%), (ANCOVA 1, p<0.05), aunque no estuvo acompañada de efectos tóxicos postingestivos (ANCOVA 2, p>0.05). Su isómero, el producto **6**, aunque presenta efectos citotóxicos frente a la línea Sf9, no produce efectos antialimentarios ni toxicidad postingestiva.

Tabla 9. Actividad antialimentaria de los persananos frente a diversos insectos diana (dosis 50 µg/cm²)

Compuesto	<i>M. persicae</i>			<i>S. littoralis</i>
	%SI ^a	%T ^b	%C ^c	%FR ^d
5	ne	ne	ne	17 ± 23
6	20.2	50 ± 21	50 ± 21	47* ± 38

ne: no se realizó el ensayo ^aPorcentaje de inhibición del asentamiento; ^bPorcentaje de pulgones asentados en el tratamiento; ^cPorcentaje de pulgones asentados en el control; ^dPorcentaje de inhibición de la alimentación; *Indica diferencias significativas respecto al control (p<0.05).

El compuesto **6** presenta una actividad antialimentaria moderada (%FR=50) con *S. littoralis*, mientras que el **5** no presentó actividad antialimentaria. Este resultado es inverso al que se produce en el ensayo de canulación (tabla 8).

En el caso del ensayo con los áfidos de la especie *M. persicae*, la inhibición del asentamiento fue nula para el compuesto **6** con un índice de inhibición del asentamiento de 20% (tabla 9). Los ensayos con la especie *R. padi* no se realizaron debido a la escasez de producto y la nula actividad observada con *Myzus*.

Tabla 10. Efectos fitotóxicos de los persananos en semillas de *L. sativa* (dosis 100 µg/cm²), expresados como % del control.

Compuesto	Germinación		Longitud radicular
	24 h	48 h	
5	67* ± 18	100 ± 0	102 ± 29
6	73* ± 7	99 ± 2	102 ± 32

*Indica diferencias significativas respecto al control (p<0.05).

En cuanto a los ensayos actividad fitotóxica, se puede observar un leve efecto sobre la germinación de *L. sativa* con los dos persanoles a las 24 horas, con unos porcentajes de germinación sobre el control de 67 y 73% de los compuestos **5** y **6** respectivamente, sin embargo no se han producido efectos significativos sobre la longitud radicular en ninguno de los dos casos.

Los persananos se han aislado únicamente de las raíces de *P. indica*, siendo el isómero **6** unas cinco veces más abundante que el isómero **5**. Su estructura consta de un biciclo [3.2.0] unido a un grupo *p*-cumaroilo. El biciclo, (1S,2R,5S)-1,4,4-

trimetilbíciclo[3.2.0]heptan-2-ol, ha sido obtenido por vía sintética como precursor del grandisol,³¹ que es una feromona de insecto.^{32.}

El grandisol actúa como atrayente y feromona sobre diversas especies de insectos de las familias Curculionidae, Cerambycidae y Scolytidae, entre las que se encuentran *Pseudopiazurus papayanus*,³³ *Rhabdoscelus obscurus*,³⁴ *Dectes texanus texanus*,³⁵ *Anthonomus grandis*,³⁶ *Pityophthorus pityographus*³⁷ y *Curculio caryae*³⁸ entre otros. Además los derivados de este tipo de bicíclos son compuestos precursores de prostaglandinas y tromboxanos.³⁹ En relación al grupo p-cumaroilo hay que destacar las propiedades antioxidantes de su derivado, el ácido cumarínico, responsables de la actividad antimutagénica y anticarcinogénica (citotóxica) de este compuesto.^{40,41,42} También presenta propiedades hepatoprotectoras,⁴³ inmunoestimuladoras,⁴⁴ gracias a la

³² Sonawane, H.R., Nanjundiah, B.S., Kumar, M.U. (1984). Synthesis of (±)-grandisol from (+) Δ²-carene: an application of photo-induced vinylcyclopropane rearrangement. Tetrahedron Lett. 25, 2245-2246.

³³ Moreira, M.A.B., Zarbin, P.H.G., Francke, W. (2004). Chemical ecology of the papaya weevil *Pseudopiazurus papayanus* (Coleoptera: Curculionidae). ISCE Ottawa. 82.

³⁴ Giblin Davis, R.M., Gries, R., Crespi, B., Robertson, L.N., Hara, A.H., Gries, G., et al. (2000). Aggregation pheromones of two geographical isolates of the New Guinea sugarcane weevil, *Rhabdoscelus obscurus*. J. Chem. Ecol. 26: 2763-2780.

³⁵ Patrick, D.R. (1974). Boll weevil sex-lure traps attract *Dectes texanus texanus* (Coleoptera: Cerambycidae). J. Ga. Entomol. Soc. 9:17.

³⁶ Cross, J.V., Hesketh, H., Jay, C.N., Innocenzi, P.J., Hall, D.R., Farman, D.I., Burgess, C.M. (2006). Exploiting the aggregation pheromone of strawberry blossom weevil *Anthonomus rubi* Herbst (Coleoptera: Curculionidae): Part 1. Development of lure and trap. Crop Prot. 25:144-154.

³⁷ Francke, W., Pan, M.L., König, W.A., Mori, K., Puapoomchareon, P., Heuer, H., Vite, J.P. (1987b). Identification of 'pityol' and 'grandisol' as pheromone components of the bark beetle, *Pityophthorus pityographus*. Naturwissenschaften. 74:343-345.

³⁸ Hedin, P.A., Dollar, D.A., Collins, J.K., Dubois, J.G., Mulder, P.G., Hedger, G.H. et al. (1997). Identification of male pecan weevil [*Curculio caryae*] pheromone. J. Chem. Ecol. 23:965-977.

³⁹ Newton, R.F., (1982). New synthetic Routes to prostaglandins and Thromboxanes. Roberts, S.M. and Scheinmann F., Ed-s; Academic Press: London, 61-104.

⁴⁰ Krizková, L., Nagy, M., Póloni, j., Dobias, J., Belicová, A. et al. (2000). Phenolic acids inhibit chloroplast mutagenesis in *Englena gracilis*. Mutat. Res. 469: 107-114.

⁴¹ Hsu, C-L., Huang, S-L., Yen, G-C. (2006). Inhibitory effect of phenolic acids on the proliferation of 3T3L1 preadipocytes in relation to their antioxidant activity. J.Agric. Foo Chem. 54: 4191-4197.

⁴² Kato, Y., Nagao, A., Terao, J., Osawa, T. (2003). Inhibition of Myeloperoxidase-catalized Tyrosylation by Phenolic Antioxidants in vitro. Biosci. Biotechnol. Biochem. 67: 1136-1139.

⁴³ Pérez-Alvarez, V., Bobadilla, R.A., Muriel, P. (2001). Structure-Hepatoprotective Activity Relationship of 3,4-Dihydroxycinnamic Acid (Caffeic Acid) Derivates. J. Appl. Toxicol. 21: 527-531.

⁴⁴ Chang, L-C., Ng, L.T., Chiang, W., Chang, M-Y., Lin, C-C. (2003). Immunomodulatory Activities of Flavonoids, Monoterpenoids, Triterpenoids, Iridoid Glycosides and Phenolic Compounds of *Plantago* Species. Planta Med., 69: 600-604.

estimulación de la proliferación linfocitaria y la secreción de IFN- γ , así como alelopáticas.⁴⁵

La actividad biológica de estos compuestos no parece sufrir modificaciones en función del tipo de isómero tanto en los ensayos con células de insecto (Sf9) y de mamífero (CHO), como en los ensayos con semillas de lechuga (*L. sativa*). Sin embargo, la configuración cis o trans del doble enlace, altera por completo la actividad de estos compuestos con larvas de *S. littoralis*. El compuesto **5** presenta actividad antialimentaria postingestiva, mientras que su isómero el compuesto **6** produce actividad antialimentaria por repelencia. Esta pareja de isómeros tiene funciones complementarias, que pueden ser un mecanismo de defensa de la planta frente a herbívoros en dos pasos. En primer lugar se impediría la alimentación de los herbívoros y si esta se llega a dar se produciría un efecto antialimentario impidiéndose que se continuara el ataque a la planta.

Los persananos producen citotoxicidad con células de insecto de *S. frugiperda* (Sf9), sin embargo no se han observado efectos tóxicos con larvas de *S. littoralis*. Esto nos lleva pensar que el sistema de detoxificación de estas larvas les permite evadir los efectos citotóxicos.

Por otro lado, se aprecia una selectividad de estos compuestos sobre insectos, ya que de las dos especies utilizadas en los ensayos, sólo se vieron afectadas las larvas de *S. littoralis*, sin que se observara ningún efecto sobre *M. persicae*. Esto puede indicar la existencia de una alta selectividad molecular en la quimiorrecepción del gusto de los insectos.

Dada la estructura de estos compuestos y teniendo en cuenta la conocida actividad alelopática del ácido p-cumarínico, cabe esperar que se produzcan efectos sobre la germinación de las semillas de *L. sativa*, lo cual ha tenido lugar, aunque con efectos moderados con ambos isómeros.

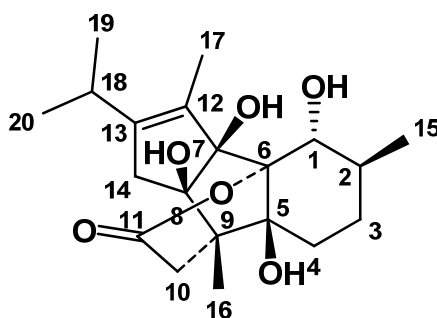
Podemos concluir que este grupo de compuestos son potenciales agentes citotóxicos, insecticidas y antiparasitarios. Los persananos pueden ser considerados

⁴⁵ Chon, S-U., Kim, Y-M., Lee, J-C. (2003). Herbicidal potencial and quantification of causative allelochemicals from several Compositae weeds. Weed Res. 43, 444-450.

moléculas mixtas, cuya actividad sería consecuencia por un lado del grupo cumariloilo (actividad citotóxica) y por otro del biciclo (relacionado con el grandisol).

1.2.3. Ryanodanos e isoryanodanos

Tras el fraccionamiento biodirigido de la fracción 5, obtenida de la primera VLC con el extracto de raíces, se aisló el ryanodano anhidrocinnzeylanina (**7**).



Este ryanodano ha sido aislado de *Cinnamomum cassia*,⁴⁶ de la parte aérea de *P. indica*⁴⁷ y también se puede obtener por tratamiento ácido de la cinnzeylanina.^{48,49}

Hemos llevado a cabo un estudio de la actividad de este ryanodano así como de otros compuestos de la misma familia previamente aislados de la parte aérea (hojas y tallos) de *P. indica*^{7,50,51,52}, como son ryanodol (**8**), cinnzeylanol (**9**), cinnzeylanina (**10**), perseanol (**11**), anhidrocinnzeylanona (**12**) y epicinnzeylanol (**13**). Este grupo de compuestos son de tipo diterpeno polihidroxipentacíclico.

⁴⁶ Yagi, A., Tokubuchi, N., Nohara, T., Nomaka, G., Nishioka, I., Koda, A. (1980). Structures of cinnassiol A and its gluoside. Chem. Pharm. Bull. 28: 1432-1436.

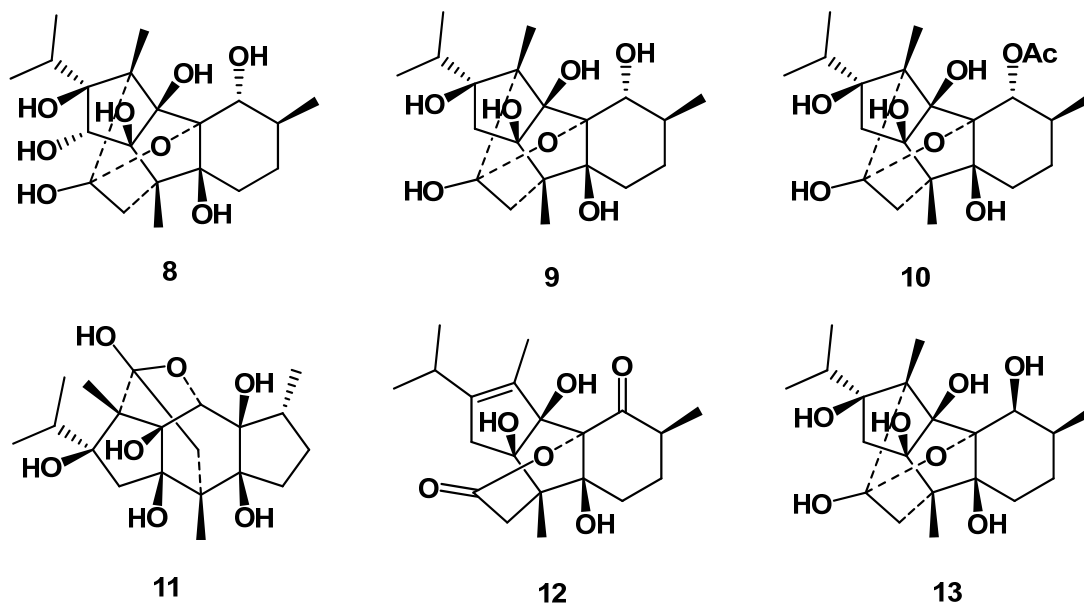
⁴⁷ Fraga, B.M., Terrero, D., Gutiérrez, C., González-Coloma, A. (2001). Minor diterpenes from *Persea indica*: their antifeedant activity. Phytochemistry. 56: 315-320.

⁴⁸ Isogai, A., Suzuki, A., Tamura, S., Murakoshi, S., Ohashi, Y., Sasada, Y. (1976). Structures of cinnzeylanine and cinnzeylanol, polyhydroxylated pentacyclic diterpenes from *Cinnamomum zeylanicum* Nees. Agric. Food Chem., 40: 2305-2306.

⁴⁹ Isogai, A., Murakoshi, S., Suzuki, A., Tamura, S. (1977). Chemistry and biological activities of cinnzeylanine and cinnzeylanol, new insecticidal substances from *Cinnamomum zeylanicum* Nees. Agric. Biol. Chem., 41: 1779-1784.

⁵⁰ Fraga, B.M., Terrero, D., Gutiérrez, C., González-Coloma, A. (2001). Minor diterpenes from *Persea indica*: their antifeedant activity. Phytochemistry. 56: 315-320.

⁵¹ González-Coloma, A., Terrero, D., Perales, A., Escoubas, P., Fraga, B.M. (1996). Insect Antifeedant Ryanodane Diterpenes from *Persea indica*. J.Agric. Food Chem. 44: 296-300.



El cinnceylanol y la cinnzeylanina han sido previamente aislados de la corteza de *Cinnamomum zeylanicum* (Lauraceae).⁴⁸

En los ensayos de actividad antiparasitaria y citotóxica de estos diterpenos ensayados no han resultado ser citotóxico se han observado efectos, tanto en células de mamífero (CHO) como frente a *L. infantum* y *T. cruzi*, ya que las ED₅₀ obtenidas han sido iguales o superiores a 100 µg/ml.

En cuanto a los ensayos realizados con células de insecto (tabla 11), tampoco se ha observado citotoxicidad con ninguno de los compuestos. En contraste con estos resultados, tenemos una elevada actividad postingestiva en el caso de los compuestos **8**, **9** y **12** (ANCOVA 1, $p < 0.05$), observándose una disminución significativa del peso de la larva así como del consumo de la dieta, con respecto al control. Además hay que destacar que en el caso del compuesto **9**, además de la actividad antialimentaria, se produjo toxicidad postingestiva (ANCOVA 2, $p = 0.00001$).

⁵²Fraga, B.M., González-Coloma, A., Gutiérrez, C., Terrero, D. (1997). Insect Antifeedant Isoryanodane Diterpenes from *Persea indica*. J. Nat. Prod. 60, 880-883.

Los ryanodanos con efectos postingestivos se pueden ordenar según su potencia, de la siguiente manera: **9>8>12**. Por el contrario **7, 10, 11** y **13** no presentaron actividad citotóxica ni antialimentaria postingestiva.

Tabla 11. Efectos tóxicos sobre *S. littoralis* (canulación oral, 40 µg/larva) y ensayos de citotoxicidad con células de *S. frugiperda* (ED₅₀ µg/ml).

Compuesto	Citotoxicidad <i>S. littoralis</i>		
	Sf9 ^a	ΔB ^b	ΔI ^c
7	> 100	102	80
8	> 100	49* pANCOVA2 = 0.29	62*
9	> 100	38* pANCOVA2 < 0.0001	63*
10	> 100	90	79
11	> 100	89	85
12	> 100	68* pANCOVA2=0.16	78*
13	> 100	85	80

*Indica diferencias significativas respecto al control (p<0.05). ^aCélulas de ovario de *S. frugiperda*. ^bCrecimiento relativo expresado con % del control (ΔB=variación del peso del insecto en mg). ^cConsumo relativo expresado como % del control (ΔI= mg de alimento consumido).

En los ensayos de actividad antialimentaria realizados con este grupo de compuestos (tabla 12) se ha observado una actividad moderada del compuesto **9** con *R. padi* (SI=53.9%) y de **11** y **12** con *M. persicae* (SI=40.4 y 50.5 % respectivamente). Los demás compuestos no presentaron actividad significativa frente a ninguno de los dos áfidos utilizados.

Por otro lado, en los ensayos con lepidópteros, cabe destacar la elevada actividad antialimentaria con larvas de *S. littoralis* de todos los ryanodanos con la excepción del compuesto **12**, cuya actividad fue moderada. Estos compuestos se pueden ordenar según la actividad antialimentaria con *S. littoralis* de la siguiente forma: **13>10>7>8>9>11**. Si comparamos la actividad de este grupo de compuestos con la del conocido insecticida ryanodina (EC₅₀=0.45 (0.2, 0.97) µg/cm²),⁵³ observamos que el compuesto **13** es unas 200 veces más activo que la ryanodina, el compuesto **10** unas 104 veces, el compuesto **7** unas 6 veces y el compuesto **8** unas 2 veces más activo, siendo el **9** y el **11** menos potentes que él.

Tabla 12. Actividad antialimentaria frente a diversos insectos diana (dosis 50µg/cm²)

Compuesto	<i>R. padi</i>			<i>M. persicae</i>			<i>S. littoralis</i>
	%SI ^a	%T ^b	%C ^c	%SI ^a	%T ^b	%C ^c	EC ₅₀
7	ne	ne	ne	33.4	45 ± 23	55 ± 23	0.08 (0.01, 0.45) ⁴⁷
8	ne	ne	ne	35.6	57 ± 20	43 ± 20	0.21 (0.1, 0.4) ⁵³
9	53.9*	32 ± 18	68 ± 18	31	55 ± 23	45 ± 23	1.22 (0.3, 5) ⁵³
10	31	43 ± 20	57 ± 20	31.5	43 ± 19	57 ± 19	4.3x10 ⁻³ (1.3 x10 ⁻³ , 0.03) ⁵³
11	31.9	49 ± 29	51 ± 29	40.4*	36 ± 20	64 ± 20	3.12 (0.88, 11.2) ⁵³
12	13.1	55 ± 17	45 ± 17	50.5*	32 ± 22	68 ± 22	>9.45 ⁴⁷
13	11.7*	58 ± 20	42 ± 20	20.4	54 ± 23	46 ± 23	2.27x10 ⁻³ (2.19x10 ⁻⁴ , 0.05) ⁵³

^aPorcentaje de inhibición del asentamiento; ^bPorcentaje de pulgones asentados en el tratamiento; ^cPorcentaje de pulgones asentados en el control; *Indica diferencias significativas respecto al control (p<0.05). EC₅₀: dosis capaz de producir un 50% de actividad expresado en µg/cm². ne: no se realizó el ensayo.

En los ensayos de fitotoxicidad realizados con *L. sativa* no se han producido efectos significativos sobre la germinación y la longitud radicular (resultados no presentados).

Persea indica, es una fuente de agentes para el control de plagas debido a su contenido en diterpenos de tipo ryanodano e isoryanodano, de conocida actividad insecticida.^{1,7,50,51,52,53}

Recientemente, se han aislado dos diterpenos de tipo ryanodano de *Erythroxylum passerium* y *Erythroxylum passeriumun*, siendo uno de ellos insecticida frente a larvas de *Aedes aegypti*.⁵⁴

Los ryanodanos también se encuentran en la naturaleza en forma alcaloidal, como es el caso de la ryanodina y sus derivados. El ryanodine es un alcaloide tóxico e

⁵³ González-Coloma, A., Gutiérrez, C., Hübner, H., Achenbach, H., Terrero, D., Fraga, B.M. (1999). Selective Insect Antifeedant and Toxic Action of Ryanoid Diterpenes. J. Agric. Food Chem. 47, 4419-4424.

⁵⁴ Barreiros, M.L., Davud, J.P., David, J.M., Xavier Lopes, L.M., de Sá, M.S., Costa, J.F.O., Almeida, M.Z., de Queiróz, L.P., Sant'Ana, A.E.G. (2007). Ryanodane diterpenes from two *Erythroxylum* species. Phytochemistry. 68: 1735-1739.

insecticida que se encuentra en la especie *Ryania speciosa* (Flacourtiaceae), nativa del Amazonas, se emplea como polvo de ryania para el control de plagas.^{55,56} Este compuesto es muy tóxico debido a la acción sobre el sistema tubular transverso en músculos, por reducción de la liberación de calcio del retículo sarcoplasmático en células musculares cardíacas.⁵⁷ Ryanodina es un tóxico no selectivo frente a insectos y mamíferos.⁵⁸ Por otro lado, el ryanodol (8), en contraste con los alcaloides de tipo ryanodina, presenta una baja toxicidad en ratones y una ligera actividad sobre receptores de mamífero, siendo un potente agente insecticida con cucarachas y moscas.⁵⁹ El punto de unión de la ryanodina tanto en mamíferos como en insectos es bastante similar, lo que sugiere que la unión del ryanodol a los receptores se produce en un punto diferente al lugar de unión de la ryanodina, confiriéndole la selectividad entre insectos y mamíferos.⁶⁰

Los estudios realizados con el ryanodol (8) y el dehidryanodol con el receptor ryr en musculatura de conejo han demostrado una potencia menor que la toxicidad que producen. Por tanto, su mecanismo de acción debe ser mediante otro tipo de canales como pueden ser los canales de K^+ .^{58,61}

Las actividades biológicas de los compuestos con esqueleto diterpeno ryanodano han sido bastante estudiadas. El ryanodine, se usa como insecticida comercial en E.E.U.U. para el control de diversas plagas (Agrisystems International, Wind Gap, PA, U.S.A.). El cinnzeylanol (9) presenta actividad insecticida produciendo ecdisis anormales

⁵⁵ Wiesner, K. (1968) The structure of ryanodine. Coll. Czech. Commun. 33: 2656-2665.

⁵⁶ Worthing, C.R. (ed). (1979). The Pesticide Manual. A World Compendium, 6th ed. British Crop Protection Council. 469.

⁵⁷ Sutko, J.L. Ito, K., Kenyon, J. (1985). Ryanodine: A modifier of sarcoplasmic reticulum calcium release in striated muscle. Fed.Proc. 44. 2984-2988.

⁵⁸ Jefferies, P.R., Toia, R.F., Brannigan, B., Pesaah, I., Casida, J.E. (1992). Ryania insecticide: analysis and biological activity of 10 natural ryanoids. J. Agric. Food Chem. 40: 142-146.

⁵⁹ Waterhouse, A.L., Pesaah, I.N., Francini, A.O., Casida, J.E. (1987). Structural aspects of ryanodine action and selectivity. J. Med. Chem. 30: 710-716.

⁶⁰ Lehmborg, E., Casida, J.E. (1994) Similarity of insect and mammalian ryanodine binding sites. Pestic. Biochem. Physiol. 48: 145-152.

⁶¹ Usherwood, P.N.R., Vals, H. (1995). Towards the development of ryanoid insecticides with low mammalian toxicity. Toxicol. Lett. 82/83: 245-247.

en larvas de *Bombix mori*.⁶² Este compuesto, como su análogo el compuesto **8**, presenta toxicidad selectiva entre artrópodos y ratones. Además, tanto el compuesto **9** como el **10** han resultado tener actividad anticomplemento⁶³ y toxicidad frente a diversas especies de insectos.⁶⁴

Los ryanodanos y los isoryanodanos aislados de *P. indica* presentan actividad antialimentaria en ensayos con *Spodoptera litura*,^{51,52} y se ha observado que la actividad insecticida se produce de forma selectiva⁵³ y mediante un mecanismo de acción no neuronal.⁶⁵

Cabe destacar la elevada actividad antialimentaria por repelencia de todos los ryanodanos con larvas de *S. littoralis*, con la excepción de la del compuesto **12**, cuya actividad fue moderada. En el caso de la actividad antialimentaria postingestiva de estos compuestos, no siguieron el mismo patrón de actuación. El compuesto **7** no presentó actividad, mientras que el compuesto **12** fue bastante activo. Estos ryanodanos resultan ser los más hidrófobos del grupo, lo cual puede influir en los mecanismos de transporte del compuesto hasta su lugar específico de acción. Vemos por tanto, que la actividad de estos compuestos depende de la especie y el tipo de tratamiento.

Las posiciones C-14 y C-1 juegan un papel importante en la actividad insecticida, como se vio anteriormente en los ensayos realizados con *S. littura*.^{51,52} La estereoquímica β del C1 (**13** frente a **9**) y su O-acetilación (**10**) aumentan la toxicidad y la actividad insecticida de estos compuestos. La hidroxilación de C-14 y la hidrofobia del anillo ciclohexánico determinan actividades antialimentarias intermedias en ryanodanos. Estudios llevados a cabo sobre las relaciones estructura-actividad de ryanodina, derivados y productos de degradación, señalan la importancia de los sustituyentes y la

⁶² Malghaes Aves, H., Coxon, D.T., Falshaw, C.P., Gotfredsen, W.O., Ollis, W.D. (1970). An. Acad. Brasil Cienc, 42, 45.

⁶³ Yagi, Tokubuchi, N., Nohara, T., Nonaka, G., Nishioka, I., Koda, A. (1980). The constituents of cinnamon cortex. I. Structures of cinnassiol A and its glucoside. Chem. Pharm. Bull., 28, 1432-1436.

⁶⁴ Isogai, A., Murakoshi, S., Suzuki, A., Tamura, S. (1977). Chemistry and biological activities of cinnzeylanine and cinnzeylanol, new insecticidal substances from *Cinnamomum zeylanicum*. Agric. Biol. Chem., 41, 1779-1784.

⁶⁵ Pessah, I.N. (1989) Recent Advances in the Chemistry of Insect Control II (Crombie, L., ed), 278. Royal Society of Chemistry, London.

estereoquímica de la posición C-14, así como la hidrofobia del anillo de ciclohexano y sus sustituyentes en la inhibición de los canales liberadores de calcio.^{58,59}

En los compuestos tipo isoryanodano como el **11**, la hidroxilación de C-1 y la polaridad del anillo A (sustituyentes en C-8 y C-13) juegan un papel importante en la actividad insecticida.⁵²

Hemos observado efectos antialimentarios por repelencia de este grupo de compuestos, así como efectos antialimentarios postingestivos, lo cual podría representar un mecanismo primario de defensa de la planta previniendo la alimentación de los insectos y un mecanismo secundario de defensa como tóxico tras la ingestión. Este tipo de defensa estaría actuando a nivel fisiológico y sensorial para reducir el ataque de insectos.

Por otro lado, cabe destacar la diferencia entre las actividades antialimentarias de estos compuestos con *S. littoralis* y áfidos, siendo en el primer caso muy altas y en el segundo caso, moderadas o nulas.

Existen evidencias que sugieren que la transducción de señales gustativas de los insectos es mediada por una interacción proteína-ligando receptor.⁶⁶ La actividad selectiva de los ryanodanos no alcaloidales sugiere una respuesta a los receptores gustativos mediada por canales iónicos dependientes de ligandos, con una sensibilidad mayor en lepidópteros que en crisomélidos.⁶⁷ Con los resultados obtenidos podemos concluir que los receptores para ryanodanos presentes en los áfidos tienen menor afinidad por éstos que los receptores de los lepidópteros.

También habría que destacar la ausencia de toxicidad con líneas celulares de insecto y mamífero, protozoos parásitos (*Leishmania* y *Trypanosoma*) y semillas de *L. sativa*, siendo bastante selectiva la actividad insecticida que presentan. Esto nos lleva a pensar

⁶⁶ Mullin, C.A., González-Coloma, A., Gutiérrez, C., Reina, M., Eichenseer, H., Hollister, B., Chyb, S. (1997). Antifeedant effects of some novel terpenoids on Chrysomelidae beetles: Comparisons with alkaloids- adapted and a nonadapted species. J. Chem. Ecol. 23, 1851-1866.

⁶⁷ González-Coloma, A., Guadaño, A., Gutiérrez, C., Cabrera, R., De la Peña, E., De la Fuente, G., Reina, M. (1998). Antifeedant *Delphinium* diterpene alkaloids. Structure-activity relationship. J. Agric. Food Chem. 46, 286-290.

en la posible ausencia de receptores de los ryanodanos en otros organismos como células y protozoos, siendo exclusivos de los insectos y explicando así su selectividad.

Ya que los efectos fitotóxicos son prácticamente nulos, así como la citotoxicidad en mamíferos, y puesto que presentan propiedades insecticidas, este grupo de compuestos pueden ser buenos candidatos para la formulación de nuevos insecticidas.

1.3. Cuantificación de compuestos mayoritarios en hojas, raíces y tallos mediante cromatografía LC-MS.

Hemos llevado a cabo un estudio para cuantificar la cantidad de los compuestos mayoritarios de la parte aérea **8** y **9** en distintos órganos de la planta. Además este método nos permite conocer el perfil metabolómico de las tres partes estudiadas, hojas, tallos y raíces.

En la siguiente figura podemos observar el cromatograma de los patrones ryanodol (**8**) y cinnzeylanol (**9**) así como sus iones moleculares.

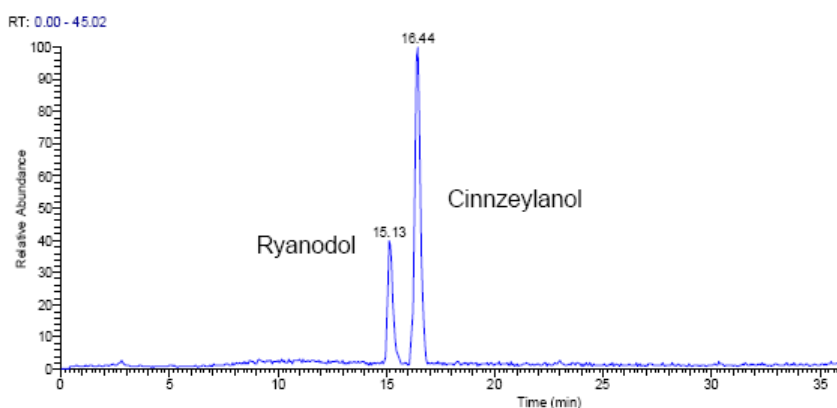


Figura 1. Cromatograma de ryanodol (**8**) y cinnzeylanol (**9**)(LC)

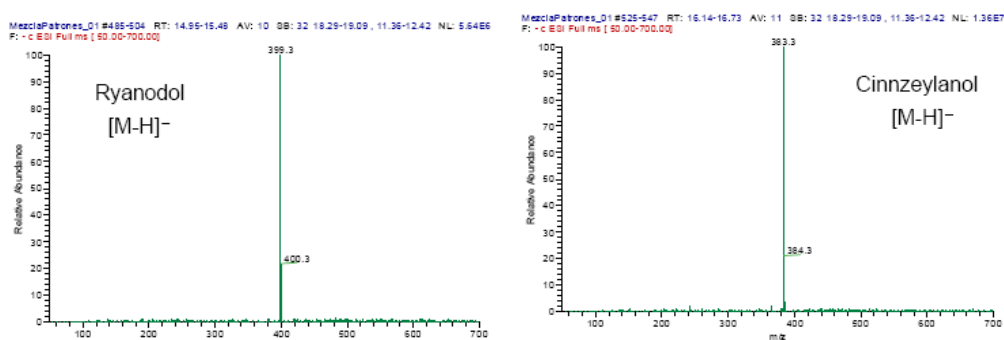
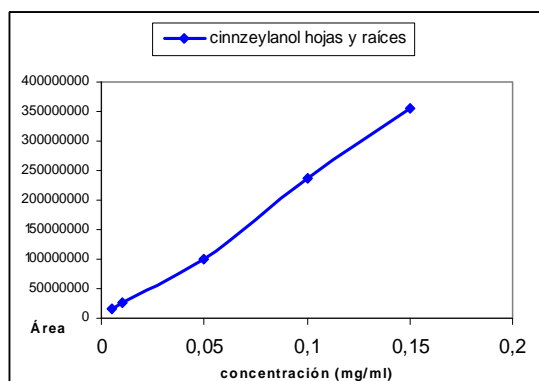


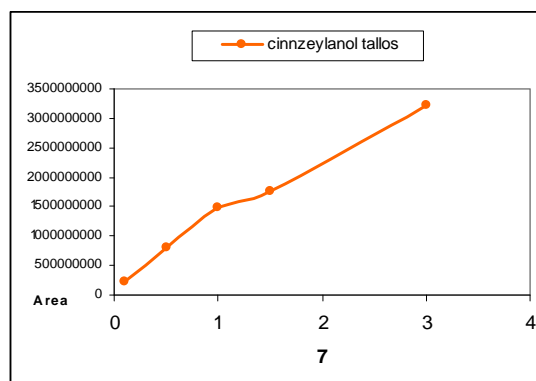
Figura 2. Iones moleculares de ryanodol (**8**) y cinnzeylanol (**9**) (LC-MS)

Curva de calibración

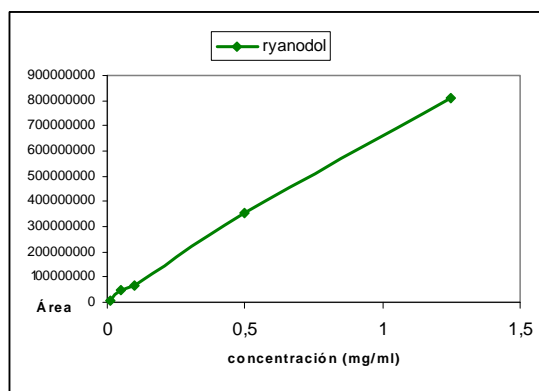
Para poder realizar la cuantificación hemos elaborado curvas de calibrado, utilizando soluciones de concentración conocida de los compuestos **8** y **9** (ryanodol y cinnzeylanol), como se muestra en las siguientes gráficas:



$$y=m+bx \text{ (} m=2.88 \times 10^8; b=9.98 \times 10^8 \text{) } r=0.993$$



$$y=m+bx \text{ (} m=-2.04 \times 10^6; b=2.36 \times 10^9 \text{) } r=0.998$$



$$y=m+bx \text{ (} m=9.17 \times 10^6; b=6.47 \times 10^8 \text{) } r=0.9994$$

En el caso del compuesto **9** hemos realizado dos calibrados, ya que con LC-MS con analizadores de trampa iónica, la linealidad de los calibrados es bastante reducida, de tal forma que hay que calibrar en intervalos pequeños para considerarlos lineales y además, las

muestras de tallos tienen una cantidad de compuesto **9** muy elevada con respecto a las de hojas y raíces.

Los resultados obtenidos (tabla 13) confirman que la mayor cantidad del compuesto **8** aparece en tallos, siendo aproximadamente el doble de la cantidad que aparece en raíces (0.115 y 0.065 mg/g extracto en tallos y raíces respectivamente). En las hojas la cantidad de este compuesto es mínima, llegando a ser casi 20 veces inferior que en los tallos (0.007 mg/g extracto).

Tabla 13. Determinación de ryanodanos en extractos de *P. indica* por LC-MS.

Extracto	mg/g de extracto	
	Compuesto 8	Compuesto 9
HOJAS	0.007	0.013
TALLOS	0.115	0.267
RAÍCES	0.065	0.001

En cuanto al compuesto **9**, hay que destacar que aparece en mayor cantidad en tallos, llegando a doblar la cantidad del compuesto **8**. Por el contrario, es prácticamente inexistente en raíces, mientras que en hojas mantiene una proporción con el compuesto **8** similar a los tallos, en relación 2:1. Estos resultados están de acuerdo con los descritos anteriormente para hojas y tallos de planta silvestre, (compuesto **8**: 0.41 ± 0.09 mg/g peso seco hojas; 1.74 ± 0.39 mg/g peso seco tallos).⁶

Además de la cuantificación de los dos ryanodanos, con este método hemos obtenido perfiles cualitativos y cuantitativos de aquellos metabolitos de hojas, tallos y raíces (gráfica 2), eluidos en las condiciones descritas en la sección de Materiales y Métodos (sección 5.1.4).

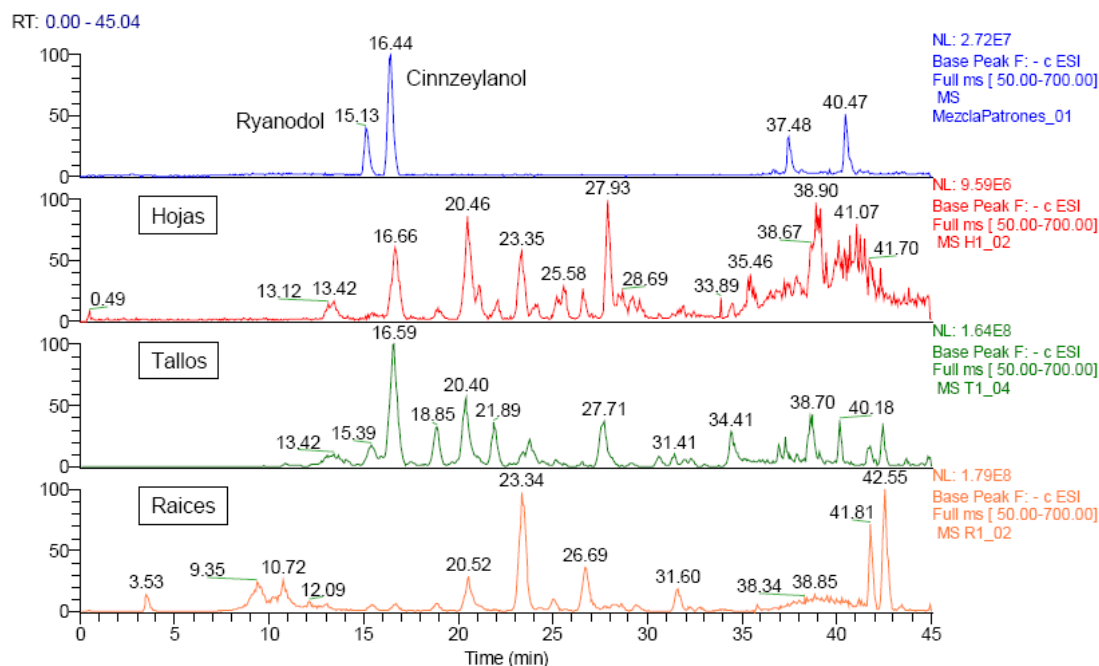


Figura 3. Cromatograma de los extractos de hojas, tallos y raíces de *P. indica*

La técnica utilizada tiene una serie de ventajas como son bajos límites de detección, posibilidad de analizar pequeñas muestras con un amplio rango de analitos de diferentes polaridades sin necesidad de un tratamiento previo de la misma, además de darnos información estructural de los metabolitos. Sin embargo, hay que tener en cuenta que esta técnica no permite detectar todos los compuestos, principalmente debido a las interferencias de otros productos presentes que coeluyen con los analitos de interés.⁶⁸ Este puede ser el motivo por el que no hemos podido detectar mediante LC-MS algunos de los compuestos previamente aislados e identificados como son las alquil lactonas descritas en el apartado 1.2 de este capítulo: compuestos **1**, **2**, **3** y **4**.

En la tabla 14, aparecen los metabolitos encontrados (iones moleculares y algunas de las atribuciones estructurales de los mismos) así como su abundancia relativa.

⁶⁸ Sulyok, M., Berthiller, F., Kska, R., Schuhmacher, R. (2006). Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the determination of 39 mycotoxins in wheat and mice. Rapid Commun. Mass Spectrom. 20: 2649-2659.

Tabla 14. Composición relativa de hojas, tallos y raíces de *P. indica*.

Tiempo de retención	Ion molecular	Compuestos identificados	Abundancia relativa (%)		
			Raíces	Tallos	Hojas
3.5	407	ni	2.40		
9.4	407	ni	6.50		
10.7	289	ni	4.70		
13.4	399	I 8		4.25	2.59
14.7	379	DHC		0.06	
15.3	399	8	1.23	3.32	0.84
16.6	383	9		19.94	7.64
16.7	397	ni	1.15		
18.8	399	I 8	1.42		
18.9	383	11/13		5.25	0.93
20.4	399	I 8	7.15	12.2	9.57
22	425	10		5.7	1.30
22.7	423	ni		0.24	
23.4	365	7	20.66		5.89
23.8	312	ni		6.02	
24	383	11/13			1.31
25.2	409	ni		0.9	
25.6	442	RM			3.47
26.4	381	C	1.98	7.75	1.78
26.7	381	I C	7.88		
27.9	431	ni			9.47
28.5	437	ni	1.73		2.52
28.9	391	ni	0.8		2.35
30.6	593	ni		1.27	
31.4	593	ni		1.33	
31.5	365	I 7	3.3		
31.9	423	ni			1.26
32.2	349	ni	0.54		
32.3	593	ni		1.41	
32.8	347	ni	0.53		
34.4	445	ni		5.65	0.63
35.5	437	ni			3.16
36.9	329	ni		1.14	
37.3	299	I 5/6		1.96	
38.7	299	I 5/6		7.18	
38.9	421	ni			11.56
40.2	239	ni		3.15	
41.7	299	5/6	8.95	2.29	
42.5	299	5/6	13.03	3.93	

ni: no identificado. **I**: isómero; **C**: cinnzeylanona; **DHC**: 2,3 dehidrocinnzeylanona; **RM**: ryanodol-14 monoacetato; **5**: perseaneno 1; **6**: perseaneno 2; **7**: anhidrocinnzeylanina; **8**: ryanodol; **9**: cinnzeylanol; **10**: cinnzeylanina; **11**: perseanol; **12**: anhidrocinnzeylanona; **13**: epicinnzeylanol.

Una vez analizada la composición química de las hojas, podemos observar que los metabolitos mayoritarios son tres compuestos no identificados de pesos moleculares

421, 431 y 399 (isómero del compuesto **8**). Así mismo, se observa la presencia de ocho metabolitos anteriormente identificados en hojas: compuesto **8**, **9**, **10**, **11**, **12**, **13**, cinnzeylanona (**C**) y ryanodol-14-monoacetato (**RM**).

Los compuestos mayoritarios de los tallos son **9**, un isómero del **8**, cinnzeylanona (**C**) y un isómero de **5** u **6**. Además aparecen compuestos sin identificar como los que presentan el ión molecular a 312 y a 445, así como otros compuestos identificados anteriormente en la parte aérea de *P. indica* como son 2,3 dehidrocinnzeylanona (**DHC**), **8**, **5** y **6**, **10**, **11**, **13**.

De todos los compuestos descritos previamente en la parte aérea de *P. indica*^{7,50,51,52,53} no se han podido identificar vignaticol, indicol, garajonona, perseafurano, avocadienofurano y avocadinofurano.

Los compuestos mayoritarios de las raíces son **5**, **6** y **7**, los cuales se han identificado anteriormente en la raíz. Además aparecen otros metabolitos que también están presentes en la parte aérea aunque en este caso en menor cantidad, como son cinnzeylanona (**C**), un isómero de la cinnzeylanona (**IC**), el compuesto **8**, dos isómeros del **8** y un isómero del compuesto **7**. Por fraccionamiento del extracto de raíz no hemos podido aislar estos compuestos, ya que son muy minoritarios. En este caso las alquil lactonas identificadas en la raíz, no se han podido identificar en estas condiciones de elución, por tanto sería necesario experimentar otros métodos con el fin de detectar esos compuestos.

Dado que en los tres perfiles analizados, hojas, raíces y tallo, hemos encontrado productos sin identificar en estudios previos, queda de manifiesto la necesidad de completar el estudio fitoquímico para identificarlos.

2. *Artemisia absinthium* L.

El ajeno (*A. absinthium*) es una especie conocida y utilizada desde la antigüedad, incluyendo, entre otros usos, su utilización en la preparación de la absenta, bebida obtenida del extracto de la planta.

Estudios recientes han demostrado diversas propiedades biológicas del aceite esencial de *A. absinthium*, incluyendo actividad antimicrobiana,⁶⁹ antiparasitaria,⁷⁰ hepatoprotectiva⁷¹ y acaricida.⁷²

En España se encuentra ampliamente representada en la flora autóctona de zonas de montaña como planta ruderal. En Aragón su presencia es más abundante a partir de los 600-700 m de altitud en zonas del Prepirineo y Valle del Jiloca, ocupando terrenos sin cultivar o ribazos.

Se trata de una planta que presenta una gran variabilidad en su composición química. Un amplio estudio sobre sus aceites esenciales ha dado como resultado la identificación de 134 compuestos.⁷³ Aceites esenciales de *A. absinthium* de diversos orígenes presentan actividad acaricida (aceite rico en tuyonas)⁷² e insecticida.^{74,75} Además, se han utilizado como repelente de pulgas, moscas,⁷⁶ mosquitos⁷⁷ y garrapatas (aceite rico en acetato de mirtenilo).⁷⁸ Por otro lado, el extracto también ha resultado tener efectos tóxicos y antialimentarios frente al escarabajo de la patata (*Leptinotarsa decemlineata*).⁷⁹

⁶⁹ Juteau, F., Jerkovic, I., Masotti V., Milos, M., Mastelic, J., Bessiere, J.M., Viano, J. (2003). Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Artemisia absinthium* from Croatia and France. *Planta Med.*69: 158-161.

⁷⁰ Rücker, G., Manns, D., Wilbert, S., (1992) Homoditerpene peroxides from *Artemisia absinthium* *Phytochemistry*. 31: 340-342.

⁷¹ Gilani, A.U. H., Janbaz, K.H. (1995). Preventive and curative effects of *Artemisia absinthium* on acetaminophen and CCL₄-induced hepatotoxicity. *Gen. Pharmacol.*, 203: 332-335.

⁷² Chiasson, H., Bélanger, A., Bostanian, N., Vincent, C., Poliquin, A. (2001). Acaricidal properties of *Artemisia absinthium* and *Tanacetum vulgare* (Asteraceae) essential oils obtained by three methods of extraction. *J. Econ. Entomol.* 94: 167-171.

⁷³ Ariño, A., Arberas, I., Renobales, G., Arriaga, S., Domínguez, J.B. (1999). Essential oil of *Artemisia absinthium* L. from the spanish Pyrenees. *J.Essen.Oil Res.* 11: 182-184.

⁷⁴ Kordali, S., Aslan, I., Calsamur, O., Calir, A. (2006). Toxicity of essential oils isolated from three *Artemisia* species and some of their major components to granary weevil, *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). *Ind. Crop Prod.* 23: 162-170.

⁷⁵ Kaul, V.K., Nigam, S.S., Banerjee, A.K. (1978). Insecticidal activity of some essential oils. *Indian J.Pharm.*40: 22.

⁷⁶ Erichsen-Brown. C. (1979). Use of plants for the past 500 years. Breezy Creeks Press. Aurora, Ontario, Canada.

⁷⁷ Morton, J.F. (1981). Atlas of medicinal plants of middle America. Charles C. Thomas, Springfield, IL:

⁷⁸ Jaenson, T.G.T., Palsson, K., Borg-Karlson, A.K. (2005). Evaluation of extracts and oils of tick-repellent plants from Sweden. *Med. Vet. Entomol.* 19: 345-352.

⁷⁹ Ertürk, Ó., Uslu, U.(2007). Antifeedant, growth and toxic effects of some plant extracts on *Leptinotarsa decemlineata* (Say.) (Coleoptera, Chrysomelidae). *Fresen. Environ. Bull.* 16: 601-607.

2.1. Estudio de poblaciones de ajeno.

El estudio de la composición química del aceite esencial de *A. absinthium* ha sido objeto de numerosos estudios.^{80,81,82,83} En la mayoría de los casos los compuestos mayoritarios son α y β -tuyonas,^{84,85} sin embargo, también se han descrito aceites de ajeno sin tuyonas,⁸¹ hecho que puede representar una ventaja en el uso de los extractos de ajeno en la industria alimentaria. En algunos casos los componentes mayoritarios encontrados son cis-epoxiocimeno,⁸⁶ acetato de crisantenilo,⁸⁵ acetato de sabinilo⁸⁷ o una mezcla de ellos,^{84,85} dependiendo principalmente del origen de la planta. De acuerdo con sus componentes mayoritarios, las poblaciones de *A. absinthium* de la Península Ibérica se dividen en siete quimiotipos con composición química significativamente distinta.⁸⁸

Además del origen, existen numerosos factores que pueden afectar a la composición del aceite esencial, como son las condiciones de crecimiento y el estado de desarrollo de la planta.⁸⁹

⁸⁰ Juteau, F., Jerkovic, I., Masotti V., Milos, M., Mastelic, J., Bessiere, J.M., Viano, J. (2003). Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil of *Artemisia absinthium* from Croatia and France. *Planta Med.* 69: 158-161.

⁸¹ Ariño, A., Arberas, I., Renobales, G., Arriaga, S., Domínguez, J.B. (1999). Essential Oil of *Artemisia absinthium* L. from the Spanish Pyrenees. *J. Essent. Oil Res.*, 11: 182-184.

⁸² Nin, S., Arfaioi, P., Boceto, M. (1995). Quantitative determination of some essential oil components of Selected *Artemisia absinthium*. *Plant. J. Essent. Oil Res.* 7: 271-277.

⁸³ Pino, J.A., Rosado, A., Fuentes, V. (1997). Chemical composition of the essential oil of *Artemisia absinthium* L. from Cuba. *J. Essent. Oil Res.* 9: 87-89.

⁸⁴ Carnat, A.P., Madesclaire, M., Chavignon, O., Lamaison, J.I. (1992). Cis- Chrysanthenol, a main component in essential oil of *Artemisia absinthium* L. growing in Auvergne (Massif Central), France. *J. Essent. Oil Res.*, 4: 487-490.

⁸⁵ Chialva, F., Liddle, P.A.P., Doglia, G. (1983). Chemotaxonomy of Wormwood (*Artemisia absinthium* L.). *Z. Lebensm. Unter. For.* 176:363-366.

⁸⁶ Chialva, F., Doglia, G., Gabri, G., Aime, S., Milone, L. (1976). Isolamento ed identificazione del cis- e trans-epossiocimene nell'olio essenziale de *Artemisia absinthium* Linnaeus italiana. *Riv. Ital. EPPOS.* 10: 522-535.

⁸⁷ Karp, F., Croteau, R. (1982). Evidence that sabinene is an essential precursor of C(3)-oxygenated thujone monoterpenes. *Arch. Biochem. Biophys.* 216: 616-624.

⁸⁸ Ariño, A. (1999). Variabilidad química en los aceites esenciales de *Artemisia absinthium* de la península Ibérica. Universidad del País Vasco, Vitoria-Gasteiz. Tesis doctoral. 133-171.

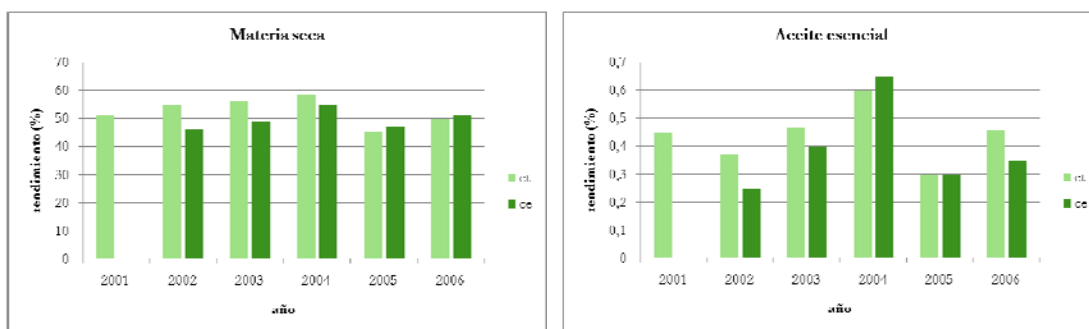
⁸⁹ Müller-Ribeau, F.J., Berger, B.M., Yegen, O., Cakir, C. (1997). Seasonal variations in the chemical composition of essential oils of selected aromatic plants growing wild in Turkey. *J. Agric. Food. Chem.* 45: 48221-4825.

La necesidad de disponer de muestras normalizadas⁹⁰ ha motivado la adaptación a cultivo en campo de una población silvestre de *A. absinthium* en dos parcelas de características agroclimáticas diferentes del Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA)-Gobierno de Aragón. Estos dos cultivos de dicha población, junto con otras poblaciones distintas, se han estudiado química y biológicamente para conocer la evolución de los metabolitos y el potencial antiparasitario e insecticida de esta especie. Para ello se han realizado valoraciones anuales de los extractos y aceites esenciales de las poblaciones mediante cromatografía de gases masa (GC-MS) y ensayos de actividad biológica (insecticida, antiparasitaria y fitotóxica).

2.1.1. Características de las poblaciones y muestras. Extractos y aceites.

Las poblaciones y muestras utilizadas han sido las siguientes:

CITA (C): Su origen es una población silvestre de la zona de San Blas (Teruel). Se ha cultivado en dos zonas agroclimáticas (Teruel: **CT**; Ejea: **CE**; ver sección 2.1.2 de Material y Métodos), durante cinco años. En las siguientes gráficas podemos observar la evolución de la producción del ajeno en las dos parcelas según los rendimientos de materia seca y aceite esencial obtenidos de acuerdo con los estudios agronómicos realizados por el Ing. J. Burillo del CITA.



Gráficos 1 y 2. Rendimiento de la población CITA en las parcelas de Ejea y Teruel durante el período 2001-2006. El rendimiento del aceite esencial está calculado en 1/100Kg materia seca (%V/P). (datos obtenidos de J. Burillo, CITA).

⁹⁰ Parejo, I., Viladomat, F., Bastida, J., Rosas-Romero, A., Flerlage, N., Burillo, J., Codina, C. (2002). Comparison between the radical scavenging activity and antioxidant activity of six distilled and non-distilled Mediterranean herbs and aromatic plants. *J Agric. Food Chem.* 50, 81-86.

El año 2004 ha sido el de mayor rendimiento de materia seca para ambas muestras (CT y CE), coincidiendo a su vez con un mayor rendimiento del aceite esencial. En relación al año 2005, aunque la cantidad de materia seca no disminuyó mucho con respecto al año anterior, el rendimiento del aceite esencial en ambas muestras fue mucho menor de lo esperado.

Con el fin de evaluar la posibilidad de realizar extracciones de compuestos no volátiles libres de disolventes orgánicos, se ha llevado a cabo la extracción con CO₂ supercrítico de estas muestras de *A. absinthium* L., como se detalla a continuación (grupo del Prof. J. Urieta, Dpto. Química; Universidad de Zaragoza).

CE03: masa de hojas y flores secas utilizadas para el experimento: 100.96 g

CT03: masa de hojas y flores secas utilizada para el experimento: 92.81 g

Tabla 15. Datos de las curvas de extracción de las dos poblaciones de ajenojo.

Muestra	Fracción	Tiempo de extracción (min)	Masa de aceite extraída (g)	KgCO ₂ /Kg
CE03	1.2	16	0.1156	3.2
	1.3	23.24	0.2353	5.2
	1.4	32	0.1172	7.3
CT03	2.1	8	0.1222	2.2
	2.2	15.23	0.1955	5.0

Una vez obtenidas las fracciones se procedió al estudio por cromatografía de gases masa (GC-MS), obteniéndose los cromatogramas que se muestran en la figura 4.

De las cuatro fracciones analizadas se han reunido las tres primeras (1.2+1.3+2.1), debido a la similitud de su composición química, dando lugar al extracto llamado **CEFS1**. Por otro lado ha quedado la fracción 2.2, de composición distinta que se ha llamado **CTFS2**.

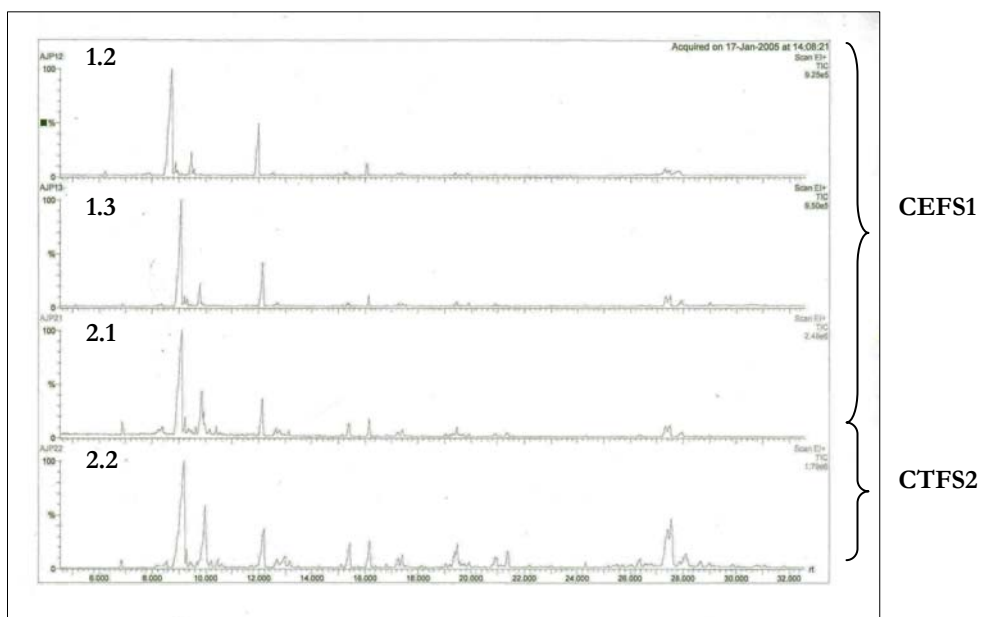


Figura 4. Cromatograma GC-MS de las fracciones obtenidas por extracción con fluidos supercríticos. Componente mayoritario cis-epoxiocimeno.

En la tabla 16 se presenta el total de muestras analizadas, procedentes de la población de San Blas (C), cultivada en Ejea y Teruel durante los años 2002-2006.

Tabla 16. Extractos y aceites obtenidos de las poblaciones de Ejea y Teruel. **Ae:** aceite esencial; **Ex:** extracto; **A:** parte aérea; **R:** raíz.

Muestra	CE	CT
Aceite esencial	CE02Ae	CT02Ae
	CE03Ae	CT03Ae
	CE04Ae	CT04Ae
	CE05Ae	CT05Ae
	CE06Ae	CT06Ae
Extracto	CE03ExA	CT02ExA
	CE05ExA	CT05ExA
	CE06ExA	CT06ExA
Fluidos supercríticos	CEFS1	CTFS2

SIERRA NEVADA (SN) (2003-2007): El origen de esta población es una donación del Vivero del Parque Nacional de Sierra Nevada. De esta planta se obtuvieron las siguientes muestras dependiendo del tipo de cultivo y extracto:

- cultivo en cámara en condiciones controladas de luz y temperatura (**SNC**):
 - aceite esencial (**SNC03Ae**), año 2003
 - extracto de parte aérea (**SNC03ExA**) y raíces (**SNC03ExR**), año 2003
 - extracto de parte aérea (**SNC07ExA**) y raíces (**SNC07ExR**), año 2007
- cultivo en invernadero (**SNI**):
 - aceite esencial (**SNI05Ae**) y el extracto de parte aérea (**SNI05ExA**), año 2005
 - extracto de parte aérea (**SNI06ExA**), año 2006

Clave: **Ae**: aceite esencial; **Ex**: extracto; **A**: parte aérea; **R**: raíz.

VILLACAMPA (2006): aceite esencial obtenido de una población silvestre de ajeno en Villacampa, Huesca, año 2006 (**VAe**).

ACEITES COMERCIALES: aceite esencial y fracciones comerciales de *A. absinthium* proporcionados por la empresa Hausmann Aromatic.

- **1**: aceite esencial de ajeno de origen americano (**H1**)
- **2**: fracción ligera de aceite esencial de ajeno, abundante en terpenos y tuyonas (**H2**). Esta fracción es un deshecho de la industria agroalimentaria y de ahí el interés de su valorización.
- **3**: fracción pesada de aceite esencial de ajeno con sesquiterpenos, ésteres y azulenos (**H3**). Esta es la parte que se comercializa.

2.1.2. Análisis de la composición química de aceites esenciales de *A. absinthium* por cromatografía de gases-masa (GC-MS).

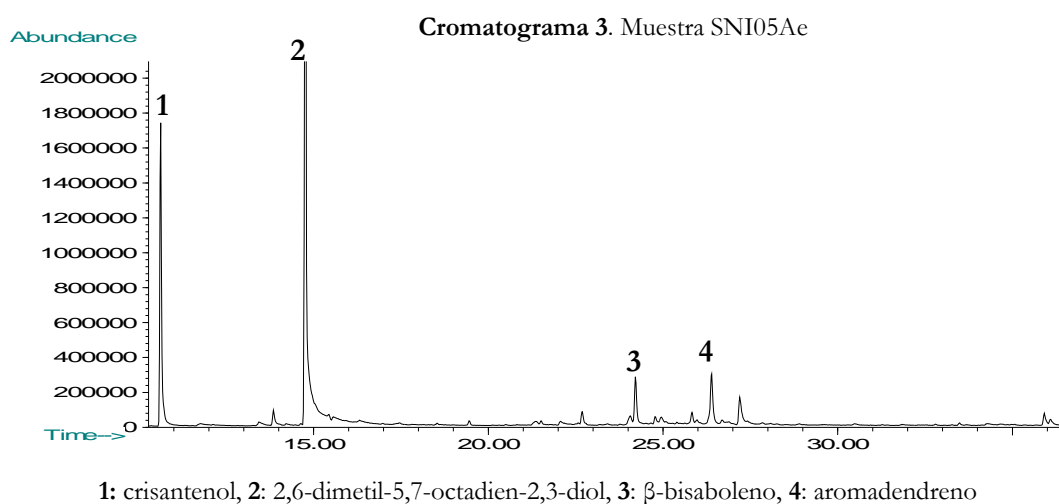
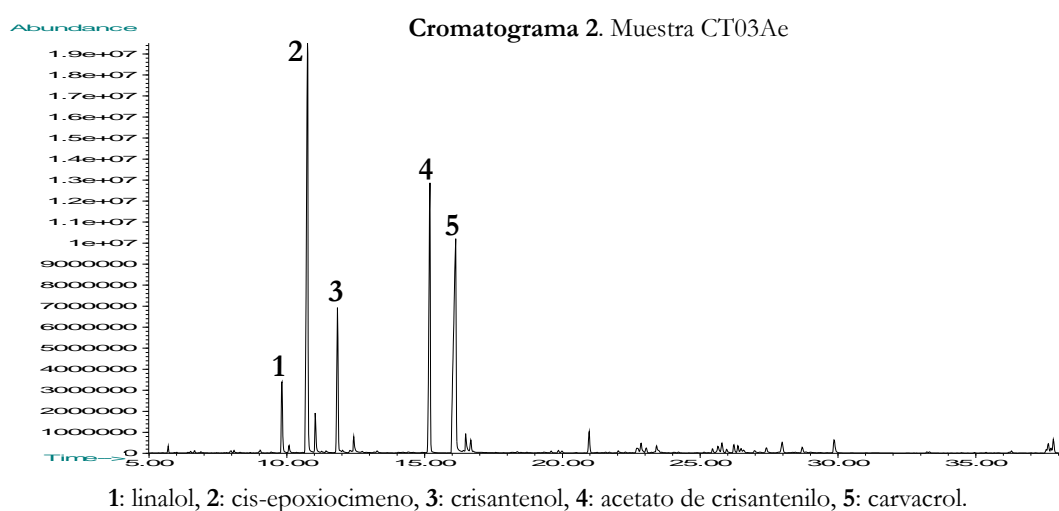
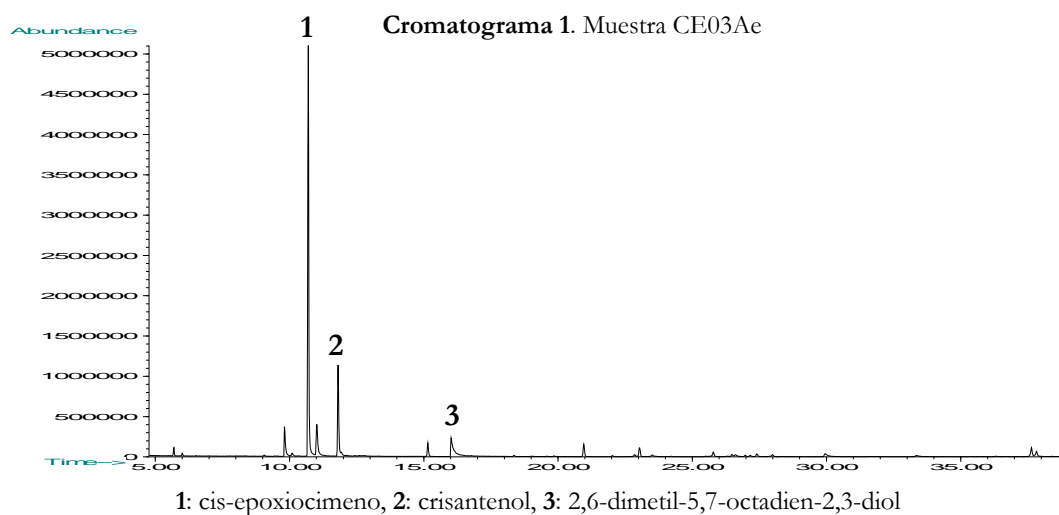
En los cromatogramas 1-5 se presenta un ejemplo de cada población. Por otro lado, en la tabla 17, aparecen los datos del análisis por GC-MS de las poblaciones de Sierra Nevada (**SN**) y Villacampa (**V**), donde de los 16 compuestos detectados, 15 fueron identificados por comparación de los espectros de masas con la base de datos Wiley. Los componentes mayoritarios de los aceites de Sierra Nevada (**SN**) son acetato de bornilo (15.1%), crisantenol (12.3%) y epibiciclosesquifelandreno (9.1%) del total de compuestos identificados (71.2%) en la población cultivada en cámara (**SNC03Ae**), y 2,6-dimetil-5,7-octadien-2,3-diol (54.1%) y crisantenol (21.4%) para la población

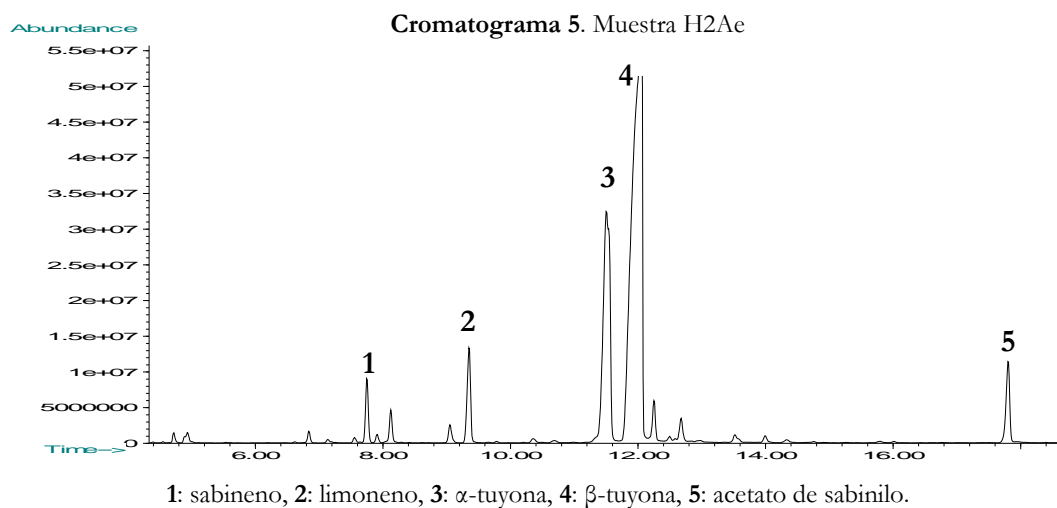
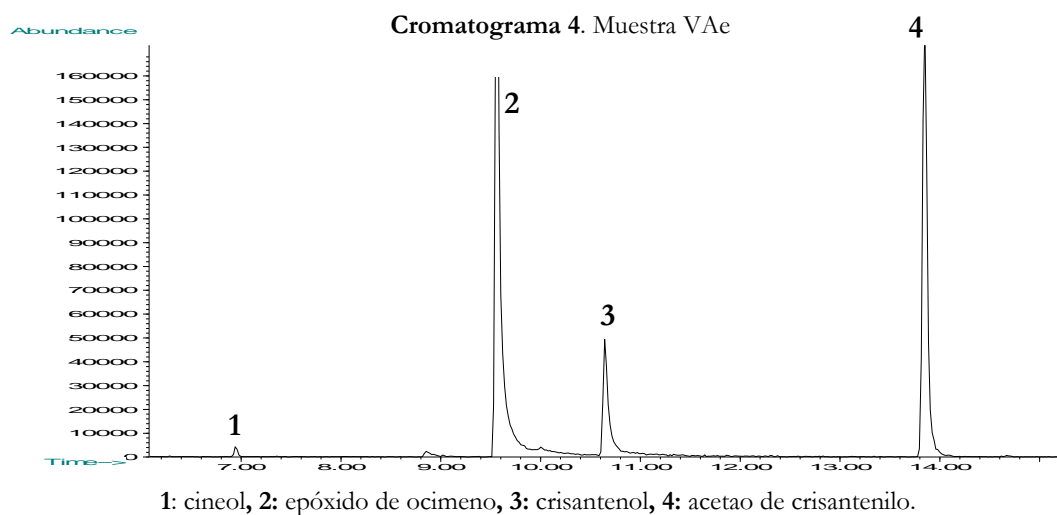
cultivada en invernadero (**SNI05Ae**, cromatograma 3), con un 86% de compuestos identificados. Se puede observar una importante variación, tanto en la composición cualitativa como cuantitativa, entre estos dos aceites de una misma población clónica cultivados en diferentes condiciones de luz y temperatura. Las condiciones no controladas del invernadero (población **SNI05Ae**), se relacionan con un aceite más rico en monoterpenos oxigenados y con una menor cantidad de sesquiterpenos.

Del mismo modo, se han observado variaciones en la composición química del aceite esencial, provocadas por las condiciones de crecimiento, en un estudio comparativo realizado con plantas de *A. absinthium* cultivadas *in vitro*, en invernadero y en campos de cultivo. Se observó cómo la composición de las plantas cultivadas *in vitro* era totalmente diferente a las otras dos, con ausencia de monoterpenos y tuyonas y presencia de compuestos de mayor peso molecular, mientras que las plantas cultivadas en invernadero y en el campo presentaron tuyonas y monoterpenos en elevada proporción.⁹¹

En el caso del aceite de la población de Villacampa (**V**) (cromatograma 4, tabla 17), observamos una composición diferente a las anteriores, con pocos componentes pero en gran proporción, como son *cis*-epoxiocimeno (50.2%), acetato de crisantenilo (35.4%) y crisantenol (10.2%), todos ellos monoterpenos oxigenados. Cabe destacar la ausencia de sesquiterpenos, tanto hidrocarbonados como oxigenados.

⁹¹ Gholami, M., Azizi, A., Salehi, P. (2005). Variations in essential oil components in cultivated and regenerated *Artemisia absinthium* L. Asian J. Chem. 17: 2229-2232.





Según la clasificación de quimiotipos llevada a cabo por Ariño,^{81,88} el aceite esencial de **Villacampa** correspondería al quimiotipo B, que presenta cis-epoxiocimeno y acetato de crisantenilo como componentes mayoritarios. Por el contrario, los aceites de la población de **Sierra Nevada** (tabla 17) presentan unos perfiles químicos que no se ajustan a los quimiotipos descritos en la Península Ibérica.

Tabla 17. Identificación de los componentes del aceite esencial de las poblaciones SN y V (abundancia relativa %).

Compuesto	SN		V
	03	05	
1,8-cineol			0.6
Cis-epoxiocimeno	7.8		50.2
Crisantenol	12.3	21.4	10.2
Acetato de bornilo	15.1		
Acetato de crisantenilo		1.5	35.4
2,6-dimetil-5,7-octadien-2,3-diol C ₁₀ H ₁₈ O ₂		54.1	
Cariofileno	5.7	1.3	
Epi biciclosesquifelandreno	9.1		
Alo aromadendreno		5.6	
Ester C ₅ nerilo/geranilo	5		
Ester C ₅ nerilo/geranilo	2.2		
Ester C ₅ nerilo/geranilo	4		
C ₁₅ H ₂₆ O sesquiterpeno	4.6		
C ₂₀ H ₂₈ O dimero ocimeno		1.2	
C ₂₀ H ₃₀ O dimero ocimeno	4.1	0.9	
C ₂₀ H ₃₀ O dimero ocimeno	1.3		
Monoterpenos hidrocarbonados	0	0	0
Monoterpenos oxigenados	51.8	79.1	96.4
Sesquiterpenos hidrocarbonados	9.1	5.6	0
Sesquiterpenos oxigenados	5.7	1.3	0
Compuestos no identificados	4.6	0	0
Total compuestos identificados (%)	71.2	86	96.4

nd: no detectado; tr: traza.

En relación a la población de Aragón (**C**), cultivada en Ejea de los Caballeros (**CE**) y Teruel (**CT**) (tabla 18), el quimiotipo de ambas es el B,^{81,88} ya que los componentes mayoritarios son cis-epoxiocimeno y acetato de crisantenilo. De los 39 compuestos detectados, 37 han sido identificados por comparación de sus espectros de masas con la base de datos Wiley. El total de compuestos identificados en ambas muestras oscila entre 80 y 95% con la excepción de los aceites **CE05Ae** y **CT06Ae**, donde el valor es de 13.5 y 4.9% respectivamente. En estos casos aparece un gran número de compuestos de alto peso molecular no identificados, y por tanto una composición química totalmente distinta a los aceites de años anteriores.

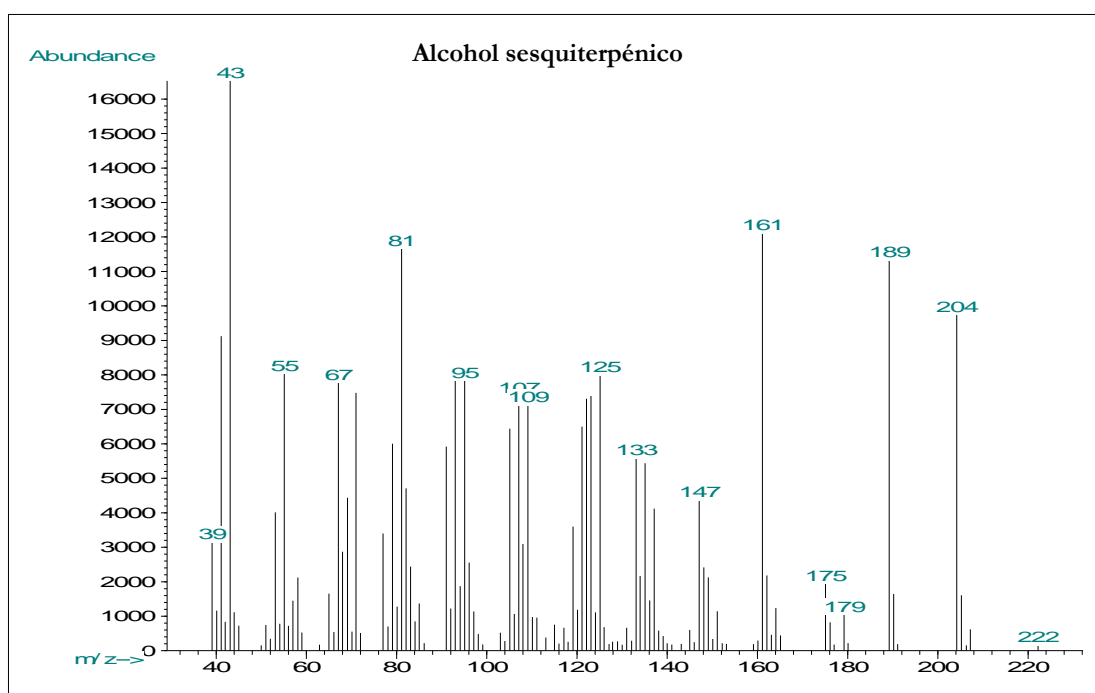
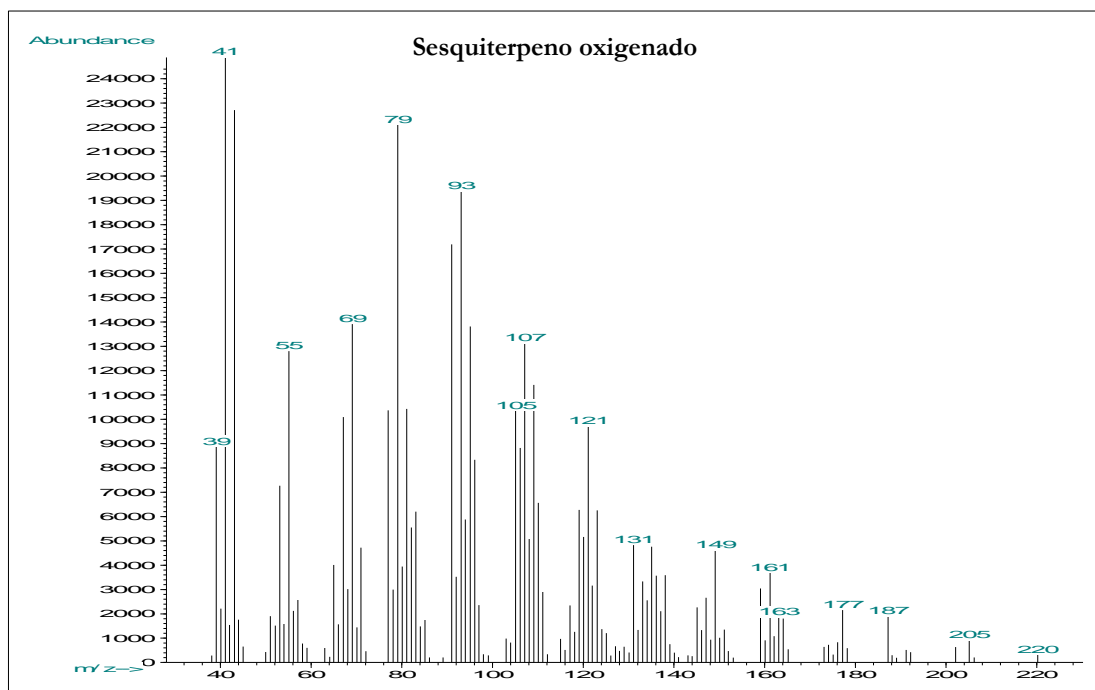
Tabla 18. Identificación de los componentes del aceite esencial de las muestras Ejea de los Caballeros y Teruel (abundancia relativa %); tr: traza.

Compuesto	CE					CT				
	02	03	04	05	06	02	03	04	05	06
α -pineno	0.4	1	0.6				0.3			
α -terpinoleno					2.4					
p-cimeno						1.4				
Sabineno	0.2		0.7							
1,8-cineol	1		2.6					1.2	0.8	
Linalol	2.6	4.8	6.2			2.3	4	2.5	4.4	
Cis-epoxiocimeno	22.8	59.9	42.7	10	9.2	33.7	31.4	46.7	4.3	
Trans-epoxiocimeno			3.4		0.9	2.4	2.1	2.7		
Alcanfor	2.5			0.3					1.9	
Crisantenol	10.1	13.2	13.1	0.4	28.8	6.5	8.2	4.2	17	
2,6-dimetil-octatrienol C ₁₀ H ₁₆ O	1.1						1.1			
Rosafurano epóxido					3.5					
α -terpineol					1.7				6.2	
Acetato de linalilo			4.2							
Acetato de crisantenilo	9.8	2.2	11.8	0.1		11.5	17.3	17.4	19.4	0.7
Timol						11.1				
2,6-dimetil-5,7-octadien-2,3-diol C ₁₀ H ₁₈ O ₂	34.3	6.3		0.5		3.2		12.8	16.7	
2,6-dimetil-5,7-octadien-2,3-diol C ₁₀ H ₁₈ O ₂	1.3									
Carvacrol						1.1	24.3			
Cariofileno	1.2	2.2	1.3	0.1	2	3.7	1.3	2.1	2.9	0.1
Ester C ₅ nerilo/geranilo					1.8					
Ester C ₅ nerilo/geranilo					3.3					
C ₁₅ H ₂₄ O sesquiterpeno					5.4					
β -selineno		1.7	1.9	0.2		1	0.6		1.2	
Óxido de cariofileno									3.7	
C ₁₅ H ₂₆ O sesquiterpeno					5.2				6.6	
Epi biciclosesquifelandreno						3.1	0.7	1.2	2.8	
Alo aromadendreno						4.3				
γ -selineno							0.9			1.4
β -bisabolol						4.2	0.3	1		
Ester C ₅ nerilo/geranilo					2.9					
Ester C ₅ nerilo/geranilo					3.7					
Ester C ₅ nerilo/geranilo					2.5					
Prochamazuleno							1	1.3	2.8	
C ₂₀ H ₂₈ O dimero ocimeno	tr		tr		2.7	tr	tr	tr	tr	
C ₂₀ H ₃₀ O dimero ocimeno	1.1	1.7	0.9	0.8	3.2	0.6	0.8	tr	tr	1
C ₂₀ H ₂₈ O dimero ocimeno	0.1		0.3	1.1		0.4	tr	tr	1	1.7
C ₂₀ H ₃₀ O dimero ocimeno	0.7	tr	0.8			0.5	0.9	0.7	2	
Monoterp. hidrocarbonados	0.6	1	1.3	0	2.4	1.4	0.3	0	0	0
Monoterpenos oxigenados	87.4	74.9	86	13.2	64.2	72.2	65.8	88.2	73.7	3.4
Sesquiterpenos hidrocarbonados	1.2	3.9	3.2	0.3	2	12.1	3.5	4.6	9.7	1.5
Sesquiterpenos oxigenados	0	0	0	0	0	4.2	0.3	1	3.7	0
Compuestos no identificados	0	0	0	0	0	1.1	24.3	0	0	0
Total comp. identificados	89.2	79.8	90.5	13.5	79.2	91	94.2	93.8	93.7	4.9

En general las dos muestras estudiadas presentan una composición química bastante similar, observándose únicamente variaciones en metabolitos minoritarios. La variación más importante se produjo en los aceites del año 2006, donde encontramos ésteres de geranilo y nerilo que no aparecían en las demás poblaciones, en el caso del aceite **CE06Ae**, y compuestos de alto peso molecular sin identificar, que no aparecen en la tabla, para el aceite **CT06Ae**. Esto nos lleva a pensar, junto con los datos de producción, que a partir del 4º o 5º año de cultivo, tanto el rendimiento del aceite esencial como la composición química, se ven afectados. Cabe destacar el crisantenol, que aparece en ambas poblaciones y aumenta con el transcurso de los años, siendo más abundante en la muestra de Ejea (**CE**) que en la de Teruel (**CT**). En cuanto al acetato de crisantenilo, se observan unos porcentajes más elevados en el caso de Teruel (**CT**). En las dos poblaciones los compuestos mayoritarios del aceite esencial son monoterpenos oxigenados.

Un aspecto a tener en cuenta a la hora de explicar el bajo rendimiento de las dos poblaciones en el año 2005, así como la variación de su composición química, es la drástica disminución de las precipitaciones que tuvo lugar en ese año (Resumen anual Climatológico 2005. INE).

En las figuras 5 y 6 se presentan los espectros de masas de los compuestos no identificados en todas las muestras de las poblaciones estudiadas, un sesquiterpeno oxigenado (Pm 220) que aparece únicamente en el aceite **CE06Ae** y un alcohol sesquiterpénico (Pm 222) que aparece en las muestras de **CE**, **CT** y en la población de **SN** (**CE06Ae**, **CT05Ae** y **SNC03Ae**).



Figuras 5 y 6. Espectro de masas sesquiterpeno oxigenado (pm 220) y un alcohol sesquiterpénico (Pm 222).

En la tabla 19 se muestran los resultados obtenidos del análisis de la composición química del aceite comercial y fracciones de ajeno (**H**).

Tabla 19. Identificación de los componentes de los aceite esenciales y fracciones comerciales H1, H2 y H3 (abundancia relativa %).

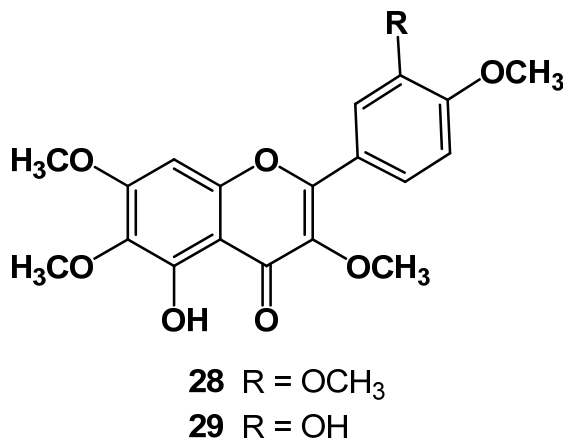
Compuesto	1	2	3
α -pineno	0.5	0.4	0.3
α -fencheno		0.2	0.4
Octenol		0.2	
Sabineno	1.8	2.5	
β -pineno		0.3	
β -mirceno	1.1	1.3	
p-cimeno	0.4	0.8	
Limoneno	3.1	4.6	
Linanol	3		
α -tuyona	10.4	22.3	2.1
β -tuyona	40.2	57.1	6.6
Cis-epoxiocimeno	1.8	2	
Tuyol	0.3	0.3	0.5
Epóxido de felandreno		1.3	
Sabinol	1.6		2.1
Lavandulol	0.9	0.5	1.1
α -terpineol	0.5	0.3	0.3
Acetato de sabinilo	27.2	4.2	59.7
Cariofileno	1		3.2
Acetato de nerilo	0.8		3.7
Epi biciclosesquifelandreno	0.4		
β -Selineno	0.8		2.7
Propionato nerilo-geranilo	0.7		2.7
Isobutirato de nerilo	1.2		2.9
Isobutirato de geranilo	0.7		2.1
Monoterpenos hidrocarbonados	6.9	10.3	0.7
Monoterpenos oxigenados	89.3	88	83.8
Sesquiterpenos hidrocarbonados	1.2	0	2.7
Sesquiterpenos oxigenados	1	0	3.2
Otros	0	0.2	0
Total compuestos identificados (%)	98.4	98.3	90.4

El aceite (**H1**) y las fracciones (**H2** y **H3**) estudiados pertenecen al quimiotipo G,^{81,88} que presenta como componente mayoritario la tuyona y derivados de su ruta metabólica, como el acetato de sabinilo. La fracción **H2**, con un 98.3% de compuestos identificados, es la que presenta una mayor concentración de tuyonas y menor de

acetato de sabinilo. Por el contrario, la fracción **H3**, con un 90.4% de compuestos identificados, presenta una elevada proporción de acetato de sabinilo y baja de tuyonas. Podemos observar como la fracción **H2** corresponde a los compuestos más ligeros y es más rica en tuyonas, mientras que la **H3** es más pesada y más rica en sesquiterpenos y ésteres. El aceite **H1** presenta un perfil intermedio entre las dos fracciones anteriores (**H2** y **H3**), con un 98.4% de compuestos identificados.

2.1.3. Análisis y cuantificación de los componentes mayoritarios de los extractos de raíz y parte aérea la población SNC.

De la población **SNC07** cultivada en condiciones controladas (cultivo aeropónico), se han obtenido extractos de parte aérea y de raíz.



Dado que las flavonas artemetina (**28**) y casticina (**29**) son los componentes mayoritarios del extracto no volátil de ajeno estudiado (**CE03**, sección 5.2.2. Material y métodos), hemos cuantificado ambos compuestos, tanto en raíz como en parte aérea, para determinar el patrón de distribución de estos metabolitos.

Curva de calibración

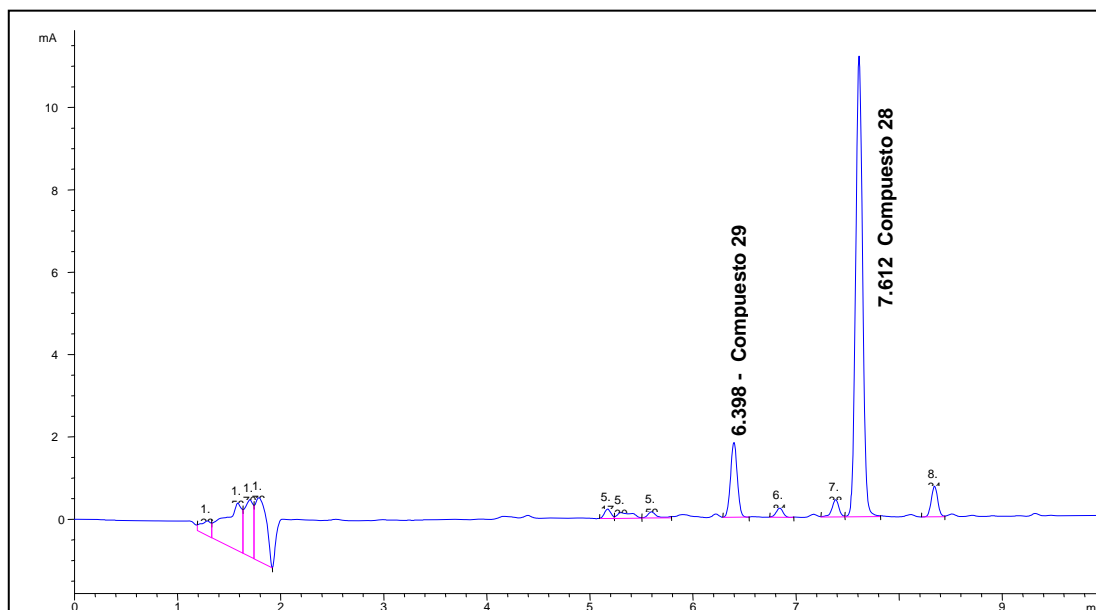
Para poder realizar la cuantificación, elaboramos dos curvas de calibrado utilizando soluciones de concentración conocida de las flavonas en estudio. En el caso de la flavona **28** utilizamos 7 puntos (0.001, 0.01, 0.1, 1, 2, 10 y 20 µg/µl) y por regresión lineal obtuvimos la ecuación de la recta:

$y=mx+b$ ($m=32503.12$, $b=-15.63$) con un coeficiente de correlación (r^2) de 0.9998.

La curva de calibrado de la flavona **29** fue obtenida con 5 puntos (0.001, 0.01, 0.1, 2, y 20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) y mediante regresión lineal obtuvimos la siguiente ecuación:

$y=mx+b$ ($m=45674$, $b=-9.93$) con un coeficiente de correlación (r^2) de 0.9999.

Una vez inyectadas las muestras de raíz y parte aérea en el HPLC obtuvimos los siguientes cromatogramas:

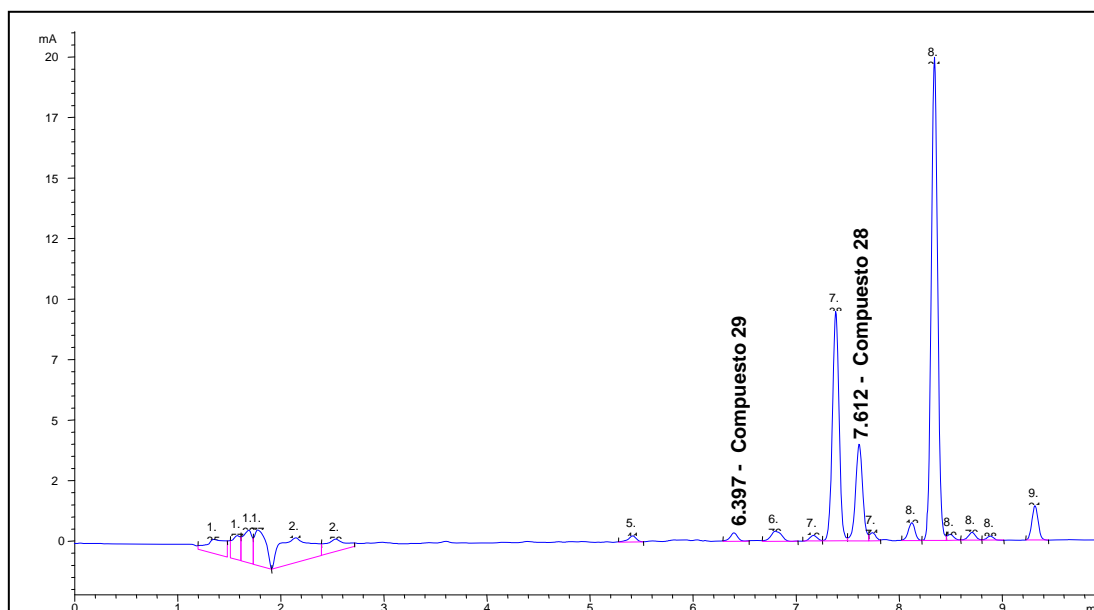


Cromatograma 6: extracto de parte aérea *A.absinthium* (SNC07).

En el cromatograma 6, podemos observar la presencia de las flavonas **28** y **29**, así como confirmar que el compuesto **28** es el compuesto mayoritario en la parte aérea del quimiotipo de *A. absinthium* estudiado, seguido del compuesto **29**. El compuesto **28** (23.2%) aparece a una concentración 4 veces superior a la del **29** (6.08%).

En las raíces (cromatograma 7) el perfil fitoquímico es totalmente diferente al de la parte aérea, observándose que los compuestos mayoritarios no son las flavonas **28** y **29** sino otros dos compuestos sin identificar (tiempos de retención). Sin embargo, aunque la cantidad disminuye unas tres veces pasando de 23.2% a 8.86% en el caso del

compuesto **28** y de 6.08% a 2.13% en el caso del **29**, la proporción entre ambos se mantiene (4:1).



Cromatograma 7: extracto de raíces de *A. absinthium* (SNC07).

Dada la elevada cantidad que aparece de estos compuestos en este quimiotipo, puede ser interesante la producción de parte aérea de *A. absinthium*, para la obtención de flavonas antioxidantes.⁹²

Debido a la diferencia entre los perfiles fitoquímicos de raíz y parte aérea sería interesante continuar con el estudio químico de las raíces tras un estudio de HPLC masa para replicar el aislamiento de compuestos conocidos.

2.1.4. Actividad biológica de extractos y aceites de las poblaciones y muestras de ajeno.

Se han llevado a cabo distintos ensayos de actividad biológica para determinar la actividad antiparasitaria, antialimentaria, repelente, fungicida y fitotóxica de los aceites y extractos las poblaciones y muestras estudiadas.

⁹² Dugas, J.A., Castañeda-Acosta, J, Bonin, G.C., Price, K.L., Fischer, N.H., Winston, G.W. (2000). Evaluation of the total peroxyl radical-scavenging capacity of flavonoids: structure-activity relationships. J.Nat.Prod. 63: 327-331.

2.1.4.1 Actividad antiparasitaria y citotóxica.

En la tabla 20 se presentan los resultados de la actividad antiparasitaria con los protozoos *L. infantum* y *T. cruzi* de las poblaciones y muestras de ajeno, así como de los ensayos para determinar la citotoxicidad inespecífica de las mismas, realizadas sobre la línea celular CHO.

Tabla 20. Ensayos de actividad leishmanicida, tripanocida (% mortalidad) y citotoxicidad sobre células de mamífero (CHO) (% viabilidad).

Extracto µg/ml	<i>L. infantum</i>			<i>T. cruzi</i>			CHO
	800	400	100	800	400	100	1000
CT02Ae	79 ± 0.2	91 ± 1	0	85 ± 3.2	89 ± 0.9	35 ± 14.6	3 ± 1.1
CE03Ae	83 ± 0.3	88 ± 1	91 ± 1.1	94 ± 1.9	92 ± 2.7	15 ± 5.2	2 ± 0.5
CE03ExA	90 ± 1.4	94 ± 2.5	44 ± 5.2	95 ± 1.3	97 ± 0.9	20 ± 8.2	ne
CEFS1	87 ± 2.5	89 ± 1.7	89 ^a ± 3.4	100 ± 0.2	100 ± 0.4	94 ^a ± 0.6	0 ^b
SNC03Ae	90 ± 1.3	96 ± 0.6	80 ± 1.6	95 ± 1	99 ± 0.3	71 ± 5	5 ± 0.2
SNC07ExA	82 ± 2	86 ± 1.7	85 ^a ± 2.6	99 ± 0.6	78 ± 1.9	53 ^a ± 2.6	ne
SNC07ExR	78 ± 0.5	81 ± 5.5	61 ^a ± 16.3	98 ± 0.4	71 ± 3.7	47 ^a ± 2.5	ne
H2	89 ± 4.6	84 ± 3.9	28 ^a ± 4	12 ± 9	0	0 ^a	0 ^b

^aensayos realizados a 200 µg/ml; ^bensayos realizados a 800 µg/ml. **ne**: no se realizó el ensayo

Para estos ensayos se seleccionaron los extractos y aceites de cada población con mejores resultados de actividad insecticida (repelente y antialimentaria; ver sección 2.1.4.2, gráficas 3 y 4). Entre ellos se encuentra el aceite de la muestra de Teruel del año 2002 (**CT02Ae**), el aceite y extractos de la muestra de Ejea 2003 (**CE03Ae**, **CE03ExA** y **CEFS1**), los extractos y aceites de la población de Sierra Nevada cultivada en condiciones controladas (**SNC03Ae**, **SNC07ExA** y **SNC07ExR**), así como la fracción **H2**. Todos ellos presentaron actividad antiparasitaria frente a *Leishmania* a todas las concentraciones ensayadas con la excepción del aceite **CT02Ae**, la fracción **H2** y el extracto **CE03ExA**, que no fueron activos a la concentración más baja.

En el caso de los *Trypanosoma* todos fueron activos a 800 y 400 µg/ml excepto la muestra **H2**, que no fue activa a ninguna concentración. Los dos únicos extractos activos a las concentraciones más bajas (100 y 200 µg/ml) fueron **SNC03ExA** y **CEFS1**, con mortalidades de 71 y 94% respectivamente.

Los componentes mayoritarios de las muestras de aceite esencial ensayadas (tuyona, acetato de bornilo, crisantenol, cis-epoxiocimeno, 2,6-dimetil-5,7-octadien-2,3-diol), así como de extractos (artemetina (**28**) y casticina (**29**)), no han sido descritos anteriormente como antiparasitarios frente a los géneros *Leishmania* y *Trypanosoma*. En ensayos con *Trypanosoma brucei rhodesiense*, la flavona **28** produce efectos sinérgicos aumentando la actividad tripanocida de otras flavonas.⁹³ Además potencia la actividad antiplasmódica de la artemisinina en *Artemisia annua*, lo cual se ha descrito también para el compuesto **29**. Tanto el compuesto **28** como el **29**, han presentado actividad antimalárica *in vitro* con parásitos de *Plasmodium falciparum*.⁹⁴ En nuestros ensayos, ninguna de las dos flavonas presentó efectos antiparasitarios con *L. infantum* y *T. cruzi* (ver sección 2.2.3, tablas 18 y 19). Por tanto, los efectos antiparasitarios observados para los extractos, pueden ser efecto de la acción sinérgica entre las flavonas y otros compuestos presentes en esas muestras.

Todos los extractos fueron citotóxicos, a una concentración de 1000 µg/ml, con una viabilidad celular que en ningún caso supera el 9%. Esto puede indicar que la toxicidad observada en los parásitos sea de tipo inespecífico. No se han descrito efectos citotóxicos de componentes mayoritarios de estas muestras con la excepción de la tuyona (con citotoxicidad frente a células Vero⁹⁵), la artemetina (**28**)⁹⁶ y la casticina (**29**),⁹⁷ que presentan actividad frente a líneas celulares tumorales. Nuestros ensayos han demostrado la actividad citotóxica de estas dos flavonas (**28** y **29**) frente a la línea CHO, mientras que solo la casticina (**29**) fue activa con la línea celular Sf9 (sección 2.2.3, tablas 33 y 34). Por tanto, el efecto citotóxico observado en los extractos puede ser debido a la

⁹³ Hoet, S., Opperdoes, F., Brun, R., Quentin-Leclercq, J. (2004). Natural products active against African trypanosomes: a step towards new drugs. Nat.Prod.Rep. 21: 353-364.

⁹⁴ Liu, K. C-S., Yang, S.L., Roberts, M.F., Elford, B.C., Phillipson, J.D. (1992). Antimalarial activity of *Artemisia annua* flavonoids from whole plants and cell cultures. Plant Cell Rep. 11: 637-640.

⁹⁵ Sivropoulou, A., Nikolaou, C., Papanikolaou, E., Kokkini S., Lanaras, T., Arsenakis, M. (1997). Antimicrobial, cytotoxic and antiviral activities of *Salvia fruticosa* essential oil. J. Agric. Food Chem. 45: 3197-3201.

⁹⁶ Ono, M., Yanaka, T., Yamamoto, M., Ito, Y., Nohara, T. (2002). New diterpenes and norditerpenes from the fruits of *Vitex rotundifolia*. J.Nat.Prod. 65: 537-541.

⁹⁷ Haidära, K., Zamir, L., Shi, Q.-W., Batist, G. (2006). The flavonoid Casticin has multiple mechanisms of tumor cytotoxicity action. Cancer Lett. 242: 180-190.

presencia de estos compuestos, pero no explican la citotoxicidad de los aceites, y puede estar relacionada con la elevada concentración en la que han sido ensayados.

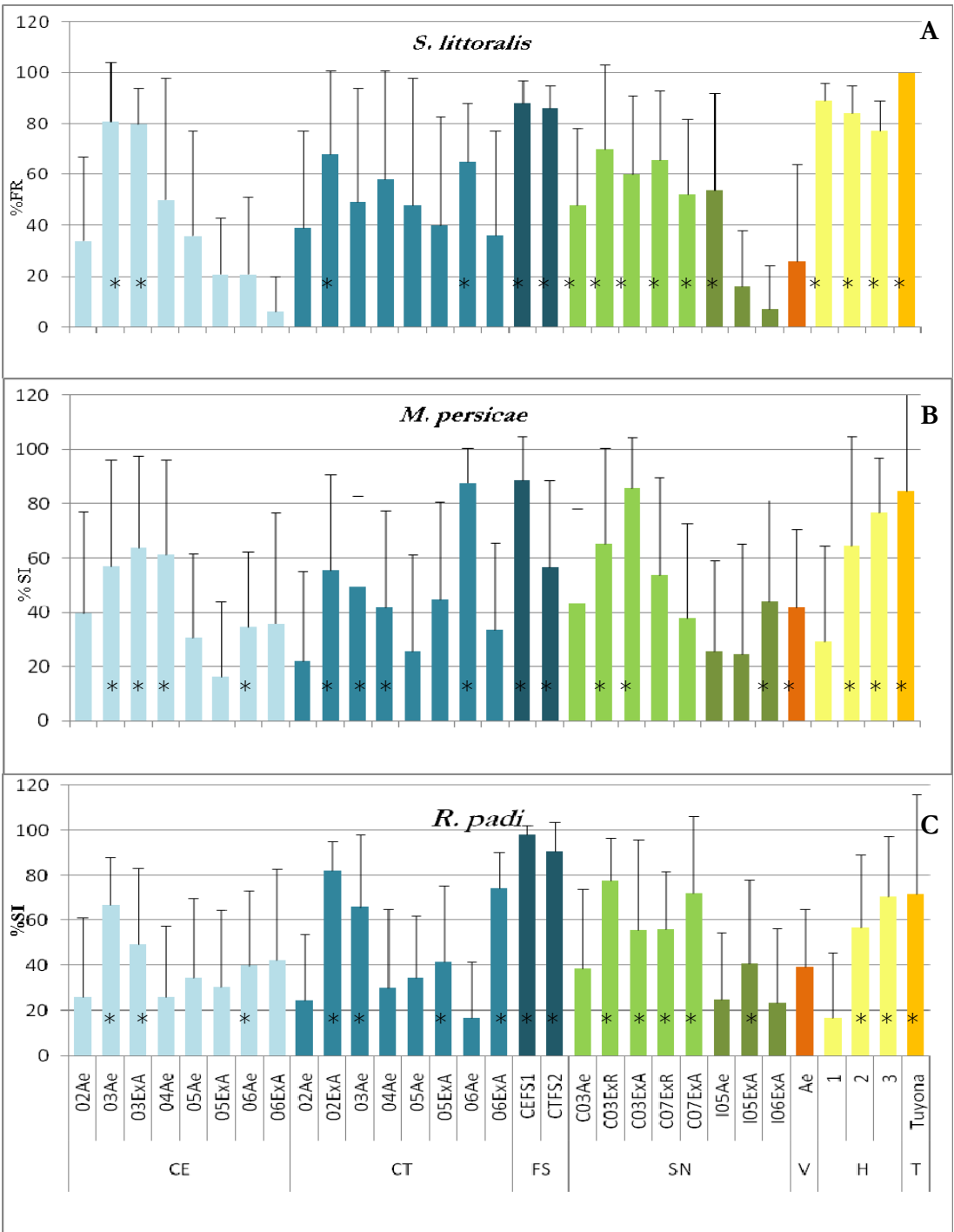
La elevada actividad antiparasitaria observada para todas las muestras ensayadas de *A. absinthium*, respaldan la continuación de su estudio como potenciales antiparasitarios.

2.1.4.2. Actividad antialimentaria y repelente de insectos

En la gráfica 3 se presentan los datos obtenidos de los ensayos de actividad antialimentaria con *S. littoralis* (A), *M. persicae* (B) y *R. padi* (C) sobre los distintos extractos y aceites de las poblaciones de *A. absinthium*.

En líneas generales, la actividad antialimentaria siguió un patrón común frente a las tres especies de insectos, siendo las muestras más activas **CE03Ae/Ex, CT02ExA, CT03Ae, CT05ExA, CEFS1, CTFS2, SNC03ExR, H2/3 y tuyona**.

Podemos observar como la mayor actividad antialimentaria con larvas de *S. littoralis* la produce la muestra **H1** (FR=89%), seguido de los extractos **CEFS1, CTFS2, H2, CE03Ae, CE03ExA, H3, SNC03ExR y CT02ExA** (FR= 88, 86, 84, 81, 80, 77, 70 y 68 % respectivamente). En relación a los ensayos realizados con pulgones de la especie *M. persicae*, la mayor actividad se ha observado en el extracto **CEFS1** (SI=89%) seguido del aceite esencial de la muestra de Teruel del año 2006 (**CT06Ae**), con un índice de inhibición del asentamiento de 88% y del extracto de parte aérea de la población de **Sierra Nevada** del año 2003 (**SNC03ExA**). Teniendo en cuenta la actividad repelente frente a este áfido de las poblaciones estudiadas, podríamos ordenarlas de la siguiente manera: **CEFS1>CT06Ae>SNC03ExA>H3>SNC03ExR>H2>CE03ExA>CE04Ae>CE03Ae>CTFS2>CT02ExA>CT03Ae>CT04Ae>CE06Ae>VAe**. Finalmente, en los ensayos llevados a cabo con la especie *R. padi*, los extractos más activos han sido los obtenidos por **fluidos supercríticos** (**CEFS1 y CTFS2**) con unos índices de inhibición del asentamiento (SI) de 98 y 91% respectivamente. Además, cabe destacar la actividad producida por el extracto de la muestra de **Teruel, CT02ExA**, con un %SI de 82%.



Gráfica 3. Actividad antialimentaria frente a de *S. littoralis* (A), *M. persicae* (B), *R. padi* (C) (dosis extractos-aceites 100µg/cm², tuyona 50µg/cm²), expresado como porcentaje de inhibición de la alimentación (%FR) y porcentaje de inhibición del asentamiento (%SI). *Indica diferencias significativas respecto al control (p<0.05).

Los extractos obtenidos por **fluidos supercríticos** han resultado ser más activos que los extractos y aceites de las muestras de **Ejea** y **Teruel** del año 2003 de las que proceden. Esto nos indica que esta metodología es la más adecuada como método de extracción de en el caso de *A. absinthium*.

En la población de **Sierra Nevada (SN)**, la actividad que presentan las plantas cultivadas en condiciones controladas (**SNC**) se mantiene a lo largo del tiempo, con variaciones moderadas. Observamos que esta actividad es mayor en el extracto que en el aceite esencial y dentro de los extractos, mayor en los de raíces que en los de parte aérea. Por el contrario, cuando la población se cultiva en invernadero sin climatizar, aumenta la actividad del aceite esencial **SNI05Ae** (2,6-dimetil-5,7-octadien-2,3-diol >50%) pero se pierde en los extractos (**SNI05ExA** y **SNI06ExA**). Por otro lado, los extractos etanólicos de parte aérea y raíz (**SNC03ExA** y **SNC03ExR**) presentan una actividad repelente frente a *M. persicae* elevada, con unos índices de inhibición del crecimiento (SI) de 86 y 65% respectivamente. La actividad desaparece con el tiempo, tanto en la población cultivada en condiciones controladas, como en la cultivada en invernadero. En los ensayos frente a *R. padi*, la actividad se concentra en los extractos, siendo nula la en los aceites esenciales. Se observan unos mayores efectos con los extractos de la población cultivada en condiciones controladas (**SNC**), invirtiéndose la actividad del 2003 al 2007 entre el extracto de raíces y parte aérea, desapareciendo en la población cultivada en invernadero.

En relación a la población procedente de **Villacampa (V)**, no se observó actividad con *S. littoralis* y *R. padi*, mientras que en el caso de *M. persicae* la actividad fue moderada (SI=42%).

En el caso de las muestras de los **aceites comerciales (H)** de ajeno y uno de los compuestos mayoritarios del aceite, la **tuyona**, se observa una mayor actividad de la tuyona en los tres ensayos. En estas muestras, la concentración de tuyona es inferior a la ensayada (50 µg/cm²) para **H1** y **H3**, siendo similar en el caso de **H2** (57%). La tuyona

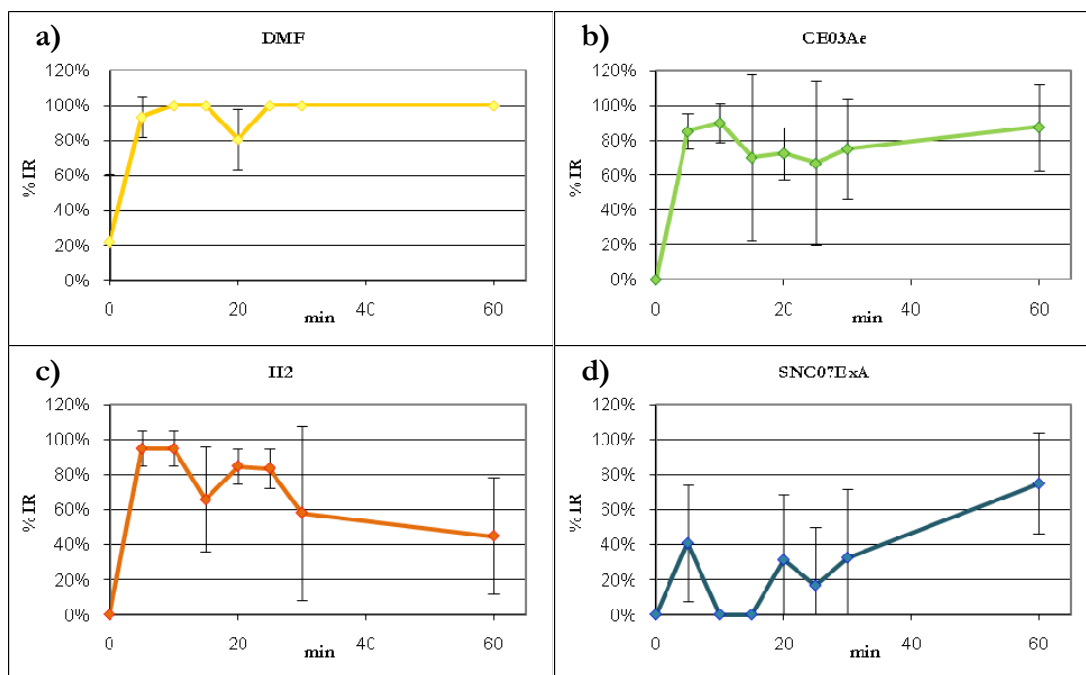
está clasificada como insecticida neurotóxico⁹⁸ y plaguicida.¹⁰⁵ Por tanto, es posible que sea responsable de parte del efecto antialimentario observado en las muestras **H**, pudiendo existir antagonismo con otros componentes. La actividad es bastante elevada con *S. littoralis* con unos índices de actividad antialimentaria superiores a 70% en todos los casos. Según esta actividad podríamos ordenarlos de la siguiente manera: **tuyona>H1≈H2 >H3**. Para los ensayos frente a *M. persicae* y *R. padi*, cabe destacar la actividad repelente de la fracción **H3** (rico en acetato de sabinilo), seguido de la **H2** (rico en tuyonas y monoterpenos), siendo nula actividad del aceite **H1**. La tuyona, uno de los componentes mayoritarios de estas muestras, ha tenido un efecto (%SI= 85 y 72 % respectivamente para ambos áfidos) que es superior al de las tres muestras comerciales (**H1**, **H2** y **H3**). También en este caso, la tuyona puede ser responsable de parte del efecto antialimentario observado, pudiendo existir antagonismo con otros componentes en las muestras **H**.

Se seleccionaron tres de los extractos más activos en ensayos de actividad antialimentaria con larvas de *S. littoralis* y la tuyona, para realizar ensayos de toxicidad postingestiva, canulando oralmente 40 µg/larva como se describe en el apartado de Material y Métodos. Los extractos seleccionados fueron **CEFS1**, **H2** y **CE03ExA**, ninguno de los cuales produjo efectos tóxicos o antialimentarios, incluida la tuyona (resultados no presentados), sugiriendo la posibilidad de que *S. littoralis* detoxifique estos extractos.

Los resultados de la actividad repelente frente a *R. prolixus* de los aceites **CE03Ae**, **H2** y el extracto **SNC07ExA** se muestran en la gráfica 4. De los dos aceites ensayados el más activo ha sido el **H2**, alcanzando un índice de repelencia máximo de 93% a los 10 minutos de ensayo, mientras que para el aceite **CE03Ae** fue de 90%. Ninguno de los dos aceites supera la actividad del control positivo dimetil ftalato (**DMF**) con una IR a los 10 minutos del 100%. Hay que destacar la ausencia de actividad del extracto no volátil utilizado (**SNC07ExA**) que empieza a aparecer a los 25

⁹⁸ Ratra, G.S., Karnita, S.G., Casida, J.E. (2001). Role of human GABA_A receptor beta-3 subunit in insecticide toxicity. Toxicol. Appl. Pharmacol. 172: 233-240.

minutos del ensayo, alcanzando un máximo a los 60 minutos. Esto puede ser debido a la baja volatilidad de los componentes del extracto en comparación con los de los aceites esenciales. Para comprobarlo, sería necesaria la realización de más ensayos tomando un mayor número de medidas entre los 30 y 60 minutos y alargando el ensayo.



Gráfica 4. Actividad repelente frente a *Rhodnius prolixus* (dosis 100 µg/cm²), expresado como índice de repelencia (%IR) en función del tiempo (minutos). a) Control positivo: dimetil ftalato (DMF); b) CE03Ae; c) H2; d) SNC07ExA

Con el fin de identificar los compuestos responsables de la actividad antialimentaria de los distintos aceites esenciales de ajeno, hemos realizado una regresión múltiple por pasos entre la composición química de los aceites esenciales de las poblaciones **CITA**, **Sierra Nevada** y **Villacampa**, por ser las más similares, y su actividad (variable dependiente). Los resultados de este análisis nos indican que la actividad antialimentaria frente *M. persicae* se explica en un 46.7% (R^2 ajustado) por la presencia del γ -selineno ($p=0.0060$). No hemos obtenido ninguna relación significativa entre los componentes de los aceites esenciales y su actividad con *R. padi* y *S. littoralis*, lo que sugiere un efecto sinergista para estos insectos.

En el caso de los ensayos con áfidos ninguno de los aceites esenciales **SN** tiene actividad repelente o antialimentaria, lo cual se ajusta a nuestra predicción ya que no presentan γ -selineno en su composición.

Los monoterpenos son compuestos abundantes en la naturaleza que reúnen las características de bajo coste y baja toxicidad, necesarias para ser unos buenos candidatos en la búsqueda de nuevas drogas. Existen monoterpenos puros que han demostrado tener actividad antiparasitaria^{99,100,101} e incluso muchos extractos de plantas y aceites esenciales ricos en monoterpenos han resultado activos frente a *Plasmodium* y *Leishmania*.^{102,103} Además, monoterpenoides como el espintanol, el piquerol A y el terpinen-4-ol, así como hidroperóxidos derivados del mentano presentan actividad tripanocida frente a *Trypanosma cruzi*.¹⁰⁴

A su vez, los monoterpenos son los componentes mayoritarios de los aceites esenciales en plantas y suelen presentar efectos repelentes. El 1,8-cineol, componente mayoritario del aceite esencial de ajeno, es repelente y tóxico con la mayoría de los insectos,¹⁰⁵ sin embargo, también presenta una actividad atrayente para algunos insectos, incluyendo las abejas.¹⁰⁶ Presenta actividad acaricida,¹⁰⁷ insecticida e inhibidora del

⁹⁹ Moura, I.C., Wunderlich, G., Uhrig, M.L., Couto, A.S., Peres, V.J. *et al.* (2001). Limonene arrests parasite development and inhibits isoprenylation of proteins in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 2553-2558.

¹⁰⁰ Goulart, H. R., Kimura, E.A., Peres, V.J., Couto, A.S., Aquino Duarte, F.A. (2004). Terpenes arrest parasite development and inhibit biosynthesis of isoprenoids in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:2502

¹⁰¹ Olangier, D., Costes, P., Berry, A., Linas, M-D., Urrutigoity, M., Dechy-Cabaret, O., Benoit-Vical, F. (2007). Modifications of the chemical structure of terpenes in antiplasmodial and antifungal drug research. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17: 6075-6078.

¹⁰² Benoit-Vical, F., Imbert, C., Bonfils, J.P., Sauvaire, Y. (2003). Antiplasmodial and antifungal activities of iridal, a plant triterpenoid. *Phytochemistry.* 62: 747-751.

¹⁰³ Do Socorro, M.D.S.S., Mendoca-Filho, R.R., Bizzo, H.R., Rodrigues, I.D.A., Soares, R.M. *et al.* (2003). Antileishmanial activity of a linalool-rich essential oil from *Croton cajucara*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47: 1895-1901.

¹⁰⁴ Kiuchi, F., Itano, Y., Uchimaya, N., Honda, G., Tsubouchi, A. *et al.* (2002). Monoterpenes hydroperoxides with trypanocidal activity from *Chenopodium ambrosioides*. *J. Nat. Prod.* 65: 509-512.

¹⁰⁵ Duke, J.A. (2007). Dr. Duke's phytochemical and ethnobotanical databases. <http://www.ars-grin.gov/duke/>.

¹⁰⁶ Williams, N.H., Whitten, W.M. (1983). Orchid floral fragrances and male euglossine bees: methods and advances in the last sesquidecade. *Biol. Bull.* 164, 355-395.

asentamiento de áfidos con *M. persicae*.¹⁰⁸ El linalol es un eficaz repelente frente a *Tyrophagus putrescentiae*,¹⁰⁹ *Culex pipiens*,¹¹⁰ *Thrips tabaci*¹¹¹ e incluso *M. persicae*.¹⁰⁸ El α -terpineol y el mirceno también son repelentes y tóxicos frente a varias especies de ácaros.¹¹² El α y β pineno producen efectos tóxicos sobre insectos.¹¹³ El epi- α -selineno ha sido identificado en secreciones de glándulas de varias especies de termitas con funciones de defensa.¹¹⁴ Además, el compuesto 2,6-dimetil-5,7-octadien-2,3-diol presenta actividad frente a *S. littoralis* (compuesto **14**, FR=62%; ver sección 2.2.2.1).

2.1.4.3. Actividad fungicida.

Se han descrito las propiedades antifúngicas de numerosos aceites esenciales, así como de algunos de sus componentes mayoritarios. El β -cariofileno y el óxido de cariofileno presentan actividad fungistática frente a varias especies de *Fusarium*,^{108,115} α -terpineol y α -terpinen-4-ol presentan actividad fungicida frente a *Aspergillus flavus*¹¹⁶ y el p-cimeno ha sido descrito recientemente como antifúngico frente a *F. oxysporum*.¹¹⁷

¹⁰⁷ Toloza, A.C., Zygaldo, J., Cueto, G.M., Biurrun, Z., Zerba, E., Picollo, M.I. (2006). Fumigant and repellent properties of essential oils and component compounds against permethrin-resistant *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae) from Argentina. J. Med. Entomol. 43: 889-895.

¹⁰⁸ Rodilla, J.M., Tinoco, M.T., morais, J.C., Gimenez, C., Cabrera, R., Martín-Benito, D., Castillo, L., González-Coloma. (2008). *Laurus novocanariensis* essential oil: Seasonal variation and valorization. Biochem. Syst. Ecol. 36: 167-176.

¹⁰⁹ Masahiko, A., Junko, E., Nakajama, S., Matsuno, K. (1990). Kyoto-fu Eisei Kogai Kenyusho Nenpo, 35, 95-100.

¹¹⁰ Won-Sik, C., Park, B.S., Ku, S.K., Lee, S.E. (2002). Repellent activities of essential oils and monoterpenes against *Culex pipiens pallens*. J. Am. Mosquito Control Assoc. 18: 348-351.

¹¹¹ Koschier, E.H., Sedy, K.A., Novak, J. (2002). Influence of plant volatiles on feeding damage caused by the onion thrips *Thrips tabaci*. Crop. Prot. 21, 419-425.

¹¹² Jaenson, T.G.T., Passon, K., Borg-Karlson, A.K. (2005). Evaluation of extracts and oils of tick-repellent plants from Sweden. Med. Vet. Entomol. 19: 345-352.

¹¹³ Choi, W.S., Park, B.S., Lee, Y.H., Jamg, D.Y., Yoon, H.Y., Lee, S.E. (2006). Fumigant toxicities of essential oils and monoterpenes against *Lycoriella mali* adults. Crop Prot. 25: 398-401.

¹¹⁴ Baker, R., Coles, H.R., Edwards, M., Evans, D.A., Howse, P.E., Walmsley, S. (1981). Chemical composition of the frontal gland secretion of *Syntermes* soldiers (Isoptera, Termitidae) J. Chem. Ecol. 7: 135-145.

¹¹⁵ Cakir, A., Kordali, S., Zengin, H., Izumi, S., Hirata, T. (2004). Composition and antifungal activity of essential oils isolated from *Hypericum hyssopifolium* and *Hypericum heterophyllum*. Flavour Frag. J. 19, 62-68.

¹¹⁶ Barra, A., Coroneo, V., Dessi, S., Cabras, P., Angioni, A. (2007). Characterization of the volatile constituents in the essential oil of *Pistacia lentiscus* L. from different origins and its antifungal and antioxidant activity. J. Agric. Fodd. Chem, 55: 7093-7098.

¹¹⁷ Sekine, T., Sugano, M., Majid, A., Fujii, Y. (2007). Antifungal effects of volatile compounds from Black Zira (*Bunium persicum*) and other spices and herbs. J. Chem. Ecol. 33: 2123-2132.

También se han descrito las propiedades antifúngicas del aceite esencial de una población de *A. absinthium* procedente de Turquía sobre 34 especies de hongos entre los que se encuentran *F. solani* y *F. oxysporum*.¹¹⁸

Los resultados de la actividad fungicida de las poblaciones y muestras de ajeno frente a tres especies del género *Fusarium* se presentan en la tabla 21.

Tabla 21. Actividad fungicida frente a hongos fitopatógenos del género *Fusarium* expresados como ED₅₀ (µg/ml).

Población		<i>F. moniliforme</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. solani</i>
Ejea	CE02Ae	>1	0,50 (0.41, 0.6)	0.57 (0.16, 0.97)
	CE03Ae	>1	>1	>1
	CE03ExA	>1	>1	>1
	CE04Ae	>1	>1	>1
	CE05Ae	>1	0.84 (-0.12, 1.18)	>1
	CE05ExA	>1	>1	>1
	CE06Ae	>1	>1	>1
	CE06ExA	>1	>1	>1
Teruel	CT02Ae	0.87 (0.77, 0.98)	0.58 (0.49, 0.68)	0.61 (0.46, 0.77)
	CT02ExA	>1	0.22 (0.14, 0.31)	>1
	CT03Ae	>1	>1	0.8 (0.54, 1.05)
	CT04Ae	>1	0.95 (0.65, 1.24)	>1
	CT05Ae	>1	0.96 (0.74, 1.17)	0.94 (0.70, 1.17)
	CT05 ExA	>1	>1	>1
	CT06Ae	0.62 (0.29, 0.94)	>1	0.92 (0.25, 1.58)
	CT06 ExA	>1	>1	>1
FS	CEFS1	>1	>1	>1
	CTFS2	>1	0.71 (0.53, 0.90)	0.89 (0.33, 1.46)
SN	SNC03Ae	>1	>1	>1
	SNC03ExA	>1	>1	>1
	SNC03ExR	>1	0.95 (0.78, 1.11)	>1
	SNC07ExA	>1	>1	>1
	SNC07ExR	>1	>1	>1
	SNI05Ae	>1	0.79 (0.54, 1.03)	>1
	SNI05ExA	>1	>1	>1
	SNI06ExA	>1	>1	>1
V	Villacampa	>1	>1	>1
H	H1	>1	>1	>1
	H2	0.56 (0.52, 0.60)	0.52 (0.50, 0.55)	0.44 (0.37, 0.49)
	H3	>1	0.58 (0.44, 0.72)	0.54 (0.38, 0.71)

ED₅₀: dosis capaz de producir un 50% de actividad.

¹¹⁸ Kordali, S., Kotan, R., Mavi, A., Cakir, A., Ala, A., Yildirim, A. (2005). Determination of the chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Artemisia dracunculus* and of the antifungal and antibacterial activities of turkish *Artemisia absinthium*, *A. dracunculus*, *A. santonicum*, and *Artemisia spicigera* essential oils. J.Agric. Food Chem. 53: 9452-9458.

La actividad fungicida más elevada ha sido la obtenida con el extracto **CT02ExA**, con una ED_{50} de 0.22 mg/ml frente a *F. oxysporum*, seguido de las muestras **H2** y **H3**, con una ED_{50} en torno a 0.5 mg/ml para las tres especies de *Fusarium* utilizadas en el caso de la fracción **H2**, y para *F. solani* y *F. oxysporum* en el caso de la **H3**. Los aceites y extractos utilizados en estas pruebas no son activos con la especie *F. moniliforme* con la excepción de los aceites **H2**, **CT02Ae** y **CT06Ae**.

Según el análisis estadístico de regresión múltiple realizado por pasos sobre los componentes identificados en los aceites esenciales de las poblaciones **CITA**, **Sierra Nevada** y **Villacampa** en relación a la actividad fungicida, la presencia del p-cimeno explica un 28.6% (R^2 ajustado) de la actividad frente a *F. solani* ($p=0.0346$), y el mismo p-cimeno ($p=0.0078$) y el 2,6-dimetil-5,7-octadien-2,3-diol ($p=0.0095$) explican un 58.58% (R^2 ajustado) de la actividad frente a *F. oxysporum*.

La población de **Sierra Nevada** sólo presenta actividad fungicida con la especie *F. oxysporum*, y la mayor actividad se observa en el aceite **SNI05Ae**, que presenta una alta proporción de 2,6-dimetil-5,7-octadien-2,3-diol (54.1%), responsable de la actividad frente a este hongo. Así mismo, hay que destacar la ausencia de actividad fungicida con el aceite esencial de la población de **Villacampa**, que no presenta en su composición ninguno de los dos compuestos que se han relacionado estadísticamente con la actividad fungicida.

En relación a la muestra de **Ejea** solo se observa actividad en el aceite **CE02Ae**, que presenta un 34.3% de 2,6-dimetil-5,7-octadien-2,3-diol, con *F. oxysporum* y *F. solani*, y el aceite **CE05Ae** con *F. oxysporum*. En el caso del aceite **CE05Ae** la actividad no es debida a ninguno de los dos compuestos que explicaban parte de la actividad fungicida citados anteriormente. La población de **Teruel** ha resultado ser la más eficaz de todas frente a las tres especies de hongos. Destacan el aceite esencial **CT02Ae**, por ser el único activo con las tres especies de todos los estudiados, y el extracto del mismo año **CT02 ExA**, por presentar la ED_{50} más baja (0.22 µg/ml). El aceite **CT02Ae** presenta p-cimeno y 2,6-dimetil-5,7-octadien-2,3-diol, que explican parte de su actividad. En relación a los extractos obtenidos por **extracción supercrítica**, sólo se observa

actividad en **CTFS2**, que proviene de la población de Teruel del año 2003, con actividad fungicida sobre *F. solani* y *F. oxysporum* ($ED_{50}=0.89$ y 0.71 mg/ml respectivamente).

Por último, en relación al aceite y fracciones comerciales (**H**), según el análisis estadístico, hemos observado que existe una correlación negativa entre la actividad antifúngica frente a *F. moniliforme* y los compuestos octenol, β -pineno y epóxido de felandreno ($p=0$ en los tres casos). El β -pineno es responsable de la actividad antifúngica de *Pistacia lentiscus*.¹¹⁹ La muestra más activa de esta población fue **H2**, que presentó actividad con las 3 especies, y es el único de los aceites comerciales activo con *F. moniliforme*. Este aceite presenta en su composición octenol, β -pineno y epóxido de felandreno, que no aparecen en **H1** y **H3**. Por otro lado, **H3** es activo frente a *F. solani* y *F. oxysporum*, aunque no hemos encontrado una correlación significativa entre la actividad y ninguno de sus componentes.

2.1.4.4. Actividad fitotóxica

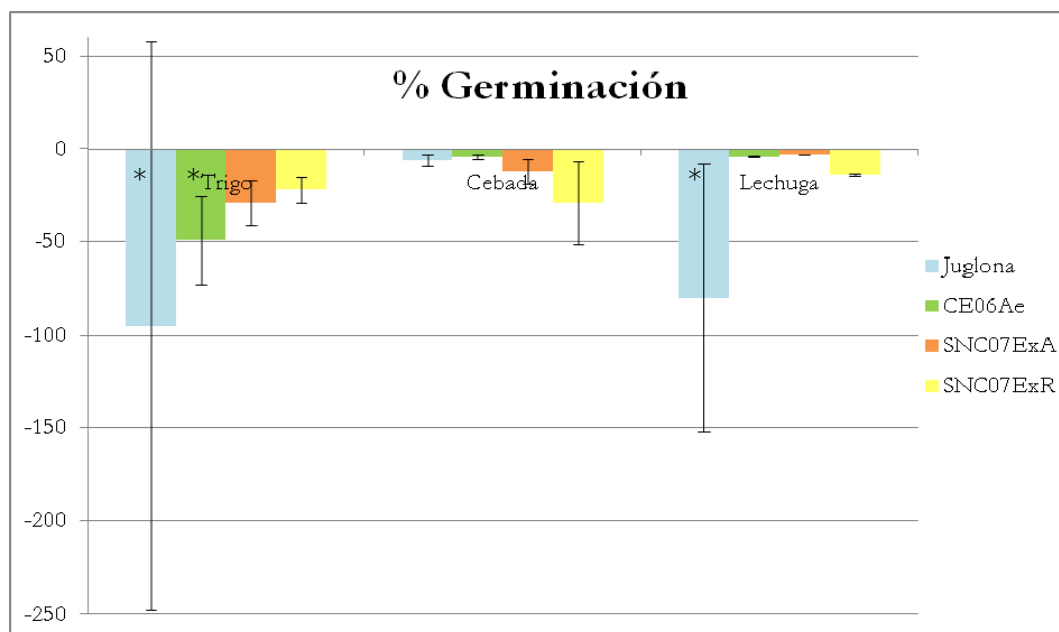
Los ensayos de actividad fitotóxica se realizaron con las muestras **CE06Ae**, **SNC07ExA** y **SNC07ExR**, seleccionadas en función de la cantidad disponible. Además se ha utilizado la **juglona**,¹²⁰ compuesto de conocida actividad alelopática, como control positivo.

En los ensayos de germinación con semillas de trigo (gráfica 5) se han podido observar efectos significativos en el caso de la **juglona** y del aceite esencial de la población de Ejea (**CE06Ae**), con unos porcentajes de inhibición de la germinación de 95 y 49% respectivamente. Los efectos sobre la germinación a las 48 horas del ensayo no fueron significativos en ninguno de los casos (resultados no presentados).

En relación a los experimentos llevados a cabo con semillas de cebada no se observó ningún efecto significativo en la germinación durante todo el ensayo (gráfica 5).

¹¹⁹ Magiatis, O., Melliou, E., Skaltsounis, A.L., Chinou, I.B., Mitaku, S. (1999). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Pistacia lentiscus* var. chia. Planta Med. 65, 749-752.

¹²⁰ Kocaçaliskan, I., Terzi, I. (2001). Allelopathic effects of walnut leaf extracts and juglone on seed germination and seedling growth. J. Hortic. Sci. Biotech. 76: 436-440.

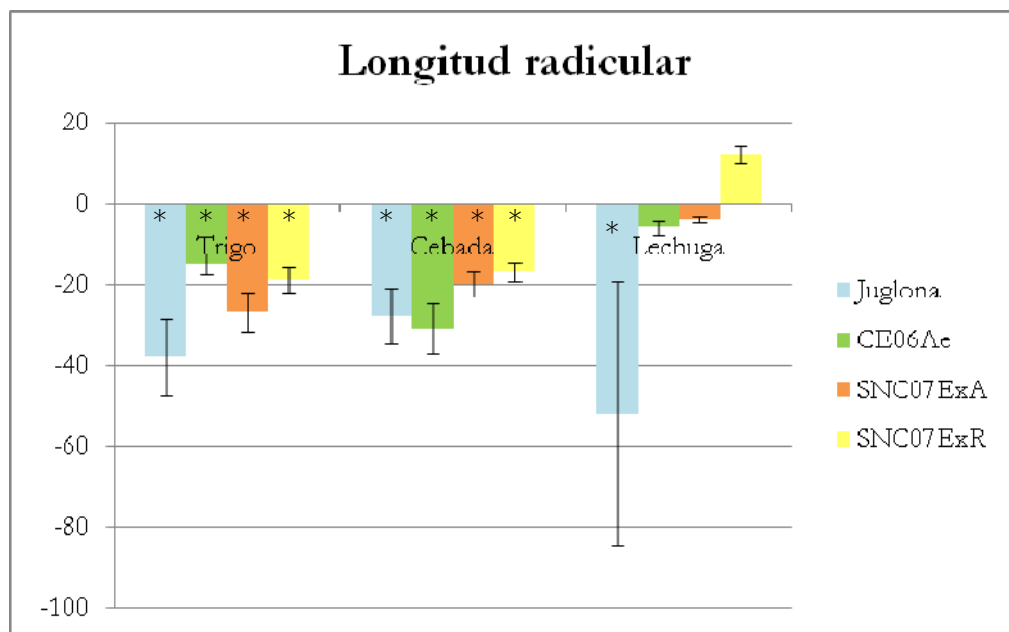


Gráfica 5. Efectos fitotóxicos germinativos con semillas de *Triticum aestivum* (trigo), *Hordeum vulgare* (cebada) y *Lactuca sativa* (lechuga), (dosis 200µg/cm²), expresados como % del control a las 24 h. *Indica diferencias significativas respecto al control (p<0.05)

En los ensayos llevados a cabo con semillas de lechuga, solo se han observado efectos inhibidores de la germinación en el caso de la **juglona**, con un porcentaje de inhibición de la germinación de 80% (gráfica 5).

Los resultados más relevantes sobre la longitud radicular (gráfica 6) han tenido lugar con la **juglona** (control positivo) en semillas de trigo y lechuga, con una disminución de la longitud radicular respecto al control de 38 y 52% respectivamente, y con el aceite esencial **CE06Ae** en el caso de las semillas de cebada (31%). Ninguno de los extractos y aceites de ajeno ensayados han tenido efecto sobre la longitud radicular en semillas de *L. sativa*.

Además de los ensayos mostrados en la gráfica 6, se han realizado otros de germinación y longitud radicular con semillas de *L. sativa* con todas las poblaciones y muestras de ajeno estudiadas, sin observarse resultados significativos en ninguna de las pruebas (resultados no presentados).



Gráfica 6. Efectos fitotóxicos sobre la longitud radicular con semillas de *Triticum aestivum*, *Hordeum vulgare* y *Lactuca sativa* (dosis 200 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), expresados como % de inhibición respecto al control a las 144 h. *Indica diferencias significativas respecto al control ($p < 0.05$).

La actividad del aceite **CE06Ae** sobre la germinación del trigo y la longitud radicular de la cebada. Estos datos nos indican cómo los efectos fitotóxicos parecen ser especie dependientes.

Se han descrito compuestos alelopáticos procedentes de especies del género *Artemisia*. *A. princeps* produce sustancias volátiles que inhiben la germinación y la longitud radicular de varias especies (*Plantago asiática*, *Achyranthes japonica*, *L. sativa*, *Chrysanthemum boreale*, entre otras),¹²¹ *A. afra* inhibe la germinación de *Brassica napus*¹²² y *A. vulgaris* inhibe la longitud del tallo y raíces de *L. sativum*.¹²³ Sin embargo, los quimiotipos ensayados aquí no fueron fitotóxicos.

¹²¹ Yun, K.W., Kil, B.S., Han, D.M. (1993). Phytotoxic and antimicrobial activity of volatile constituents of *Artemisia princeps* var. *orientalis*. J.Chem.Ecol. 19: 2757-2763.

¹²² Ammann, N., & Pieterse, P. J. (2005). Effects of *Artemisia afra* leaf extracts on seed germination of selected crop and weed species. S. Afri. J. Plant Soil, 22: 263-265.

¹²³ Barney, J.N., Hay, A.G., Weston, L. A. (2005). Isolation and characterization of allelopathic volatiles from mugwort (*Artemisia vulgaris*). J. Chem Ecol. 31: 247-265.

2.2. Estudio fitoquímico y biológico del extracto de parte aérea de la muestra CE03ExA.

Teniendo en cuenta todas las poblaciones de *A. absinthium* estudiadas, se ha llegado a la conclusión de que la mejor producción ha sido la obtenida a los 3 años de cultivo de la muestra de Ejea, tanto por sus propiedades biológicas como por su alto rendimiento. Por este motivo dicho extracto ha sido seleccionado para su estudio fitoquímico.

Una vez seca la planta se obtuvo el extracto crudo de la parte aérea, para posteriormente y mediante las técnicas cromatográficas ya citadas, realizar el aislamiento de los productos responsables de la actividad biológica.

2.2.1. Actividad biológica del extracto crudo y las fracciones de la muestra CE03ExA.

El extracto acetónico de la parte aérea de *A. absinthium* dió lugar, mediante VLC (cromatografía líquida de vacío), a una serie de fracciones, las cuales fueron ensayadas frente a varias especies de insectos diana, con el fin de determinar su actividad antialimentaria.

El resultado de la actividad antialimentaria de las fracciones (tabla 22), fue menor en todos los ensayos que el obtenido con el extracto crudo (**CE03ExA**), lo que podría ser explicado por un efecto de sinergismo en la muestra total.

Cabe destacar la elevada actividad antialimentaria del extracto de ajeno con larvas de *S. littoralis* (%FR=81) y con *R. padi* (%SI=63.8). En el caso de las fracciones, la 10-11 y la 12, han sido las que presentaron una mayor actividad antialimentaria, tanto con *S. littoralis* (%FR=61 y 60) como con *M. persicae* (%SI=48.6 y 60). En ninguna de las fracciones se observó una actividad significativa con *R. padi*. Solo la fracción 13 presentó una moderada actividad sobre este áfido (%SI=32.5).

Tabla 22. Actividad antialimentaria de las fracciones obtenidas de VLC-1 del extracto crudo de la parte aérea de *A. absinthium*, frente a diferentes insectos diana (dosis 100 µg/cm²).

Fracción / extracto	<i>S. littoralis</i>		<i>R. padi</i>		<i>M. persicae</i>		
	%FR ^a	%SI ^b	%T ^c	%C ^d	%SI ^b	%T ^c	%C ^d
1	14 ± 20	15.7	53 ± 17	47 ± 17	20.4	52 ± 19	48 ± 19
2	28 ± 17	24	44 ± 12	56 ± 12	23.4	47 ± 18	53 ± 18
3	51 ± 41	7.4	60 ± 19	40 ± 19	11.4	55 ± 16	45 ± 16
4-5	32 ± 43	26.9	46 ± 16	54 ± 16	9.7*	64 ± 23	36 ± 23
6-7	48* ± 48	24.2	58 ± 35	42 ± 35	19.7	53 ± 25	47 ± 25
8-9	17 ± 17	19.8	54 ± 25	46 ± 25	13.4	59 ± 19	41 ± 19
10-11	61* ± 41	34.1	43 ± 25	57 ± 25	48.6*	38 ± 18	62 ± 18
12	60* ± 35	40.7	41 ± 29	59 ± 29	60*	26 ± 13	74 ± 13
13	44* ± 33	32.5*	41 ± 14	59 ± 14	47.4*	33 ± 17	67 ± 17
15	37 ± 27	17.1	54 ± 20	46 ± 20	29.9	44 ± 22	56 ± 22
17	29 ± 37	14.5	55 ± 20	45 ± 20	37*	39 ± 19	61 ± 19
23-24	19 ± 27	28.9	45 ± 23	55 ± 23	21.4	52 ± 22	48 ± 22
CE03ExA	81* ± 23	63.8*	25 ± 20	75 ± 20	49.4*	32 ± 20	68 ± 20

^aPorcentaje de inhibición de la alimentación; ^bPorcentaje de inhibición del asentamiento; ^cPorcentaje de pulgones asentados en el tratamiento; ^dPorcentaje de pulgones asentados en el control.*Indica diferencias significativas respecto al control (p<0.05).

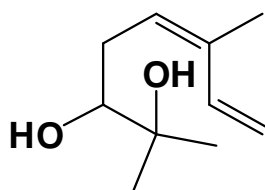
2.2.2. Compuestos resultantes del fraccionamiento biodirigido.

La separación por técnicas cromatográficas de las fracciones anteriores nos ha permitido aislar una serie de compuestos que hemos agrupado según su estructura química en terpenos, compuestos fenólicos y lignanos.

2.2.2.1. Terpenos

Monoterpenos

Mediante fraccionamiento biodirigido de la fracción 14, obtenida del primer fraccionamiento (VLC) del extracto crudo de ajeno, hemos aislado un compuesto con estructura monoterpénica, (Z)-2,6-dimetilocta-5,7-dien-2,3-diol (**14**), derivado del epóxido de ocimeno. Este compuesto ha sido detectado mediante GC-MS en el aceite esencial de ajeno CE03Ae, en una proporción de 6.3 %, siendo más abundante en la muestra CE02Ae (35.6%). El epóxido de ocimeno, junto con este compuesto, representan un 66.3% del aceite esencial.



Este monoterpeneo ha sido aislado previamente de *Aster bakeranus*¹²⁴ y *Passiflora quadrangularis*.¹²⁵

En las tablas 23 y 24 se muestran los resultados de actividad biológica obtenidos con este compuesto.

El producto **14** no produce actividad antiparasitaria con los protozoos *Leishmania* y *Trypanosoma* ni citotoxicidad en células de mamífero CHO, ya que en todos los casos la ED₅₀ ha sido superior a 100 µg/ml (resultados no presentados).

Tabla 23. Efectos tóxicos sobre *S. littoralis* (canulación oral, 40 µg/larva) y ensayos de citotoxicidad con células de *S. frugiperda* (ED₅₀ µg/ml).

Compuesto	Citotoxicidad	<i>S. littoralis</i>	
	Sf9 ^a	ΔB ^b	ΔI ^c
14	>100	120*	110

*Indica diferencias significativas respecto al control ($p < 0.05$). ^aCélulas de ovario de *Spodoptera frugiperda*. ^bCrecimiento relativo expresado con % del control (ΔB=variación del peso del insecto en mg). ^cConsumo relativo expresado como % del control (ΔI= mg de alimento consumido).

No se han observados efectos citotóxicos sobre la línea de células de insecto Sf9 (ED₅₀>100 µg/ml, tabla 23). En cuanto a la toxicidad postingestiva con larvas de *S. littoralis* solo cabe destacar un moderado incremento del peso (ANCOVA 1 $p < 0.05$), que no es consecuencia del incremento en la ingesta, ya que este valor no presenta diferencias significativas con respecto al control. Se ha producido, por tanto, una alteración metabólica por la ingestión del producto que ha provocado el aumento de peso de las larvas.

¹²⁴ Tsankova, E., Bohlmann, F. (1983). A monoterpene from *Aster bakeranus*. *Phytochemistry*, 22: 1285-1286.

¹²⁵ Duque, C.; Fujimoto, Y., Osorio, C., (2000). Oxygenated monoterpenoids from badea (*Passiflora quadrangularis*) fruit pulp. *Phytochemistry*. 53: 97-102.

Tabla 24. Actividad antialimentaria frente a *M. persicae* y *S. littoralis* (dosis 50 µg/cm²)

Compuesto	<i>M. persicae</i>		<i>S. littoralis</i>	
	%SI ^a /EC ₅₀	%T ^b	%C ^c	%FR ^d
14	25.3	46 ± 23	54 ± 23	62* ± 38

^aPorcentaje de inhibición del asentamiento; ^bPorcentaje de pulgones asentados en el tratamiento; ^cPorcentaje de pulgones asentados en el control; ^dPorcentaje de inhibición de la alimentación; *Indica diferencias significativas respecto al control (p<0.05). EC₅₀: dosis capaz de producir un 50% de actividad.

Este monoterpeno no presenta actividad antialimentaria con el áfido *M. persicae*. En este caso no se han realizado ensayos con *R. padi* debido a la pequeña cantidad de producto aislado. Sin embargo, sí se han observado efectos antialimentarios significativos, aunque de tipo moderado, con larvas de *S. littoralis*, con una inhibición de la alimentación de 62% (FR) (tabla 24).

En cuanto a los efectos fitotóxicos del compuesto **14** son prácticamente nulos, tanto en la germinación de las semillas como en la variación de la longitud radicular, con semillas de *L. sativa* (resultados no presentados).

Aunque existen numerosos casos de monoterpenos con actividad antiparasitaria, en nuestro caso no se ha observado ningún tipo de efecto con promastigotes de *L. infantum* y epimastigotes de *T. cruzi*. Dada la riqueza en monoterpenos del aceite esencial y la elevada actividad tanto del extracto como del aceite de *A. absinthium*, es posible que otros monoterpenos presentes en esta planta sean los responsables de la actividad antiparasitaria, o que actúe de manera sinérgica con otros compuestos. Guillet *et al.*,¹²⁶ en un estudio realizado con monoterpenos volátiles con *Ostrinia nubilalis* (lepidóptero), concluyeron que los monoterpenos estaban produciendo un efecto sinérgico gracias a la retención de metabolitos secundarios tóxicos en los tejidos del insecto. Además, se ha sugerido que los monoterpenos actúan como agentes de almacenamiento y liberación de

¹²⁶ Guillet, G., Belanger, A., Arnason, J.T. (1998). Volatile monoterpenes in *Porophyllum gracile* and *P. ruderale* (Asteraceae). *Phytochemistry*. 49: 423-429.

metabolitos secundarios lipófilos en la planta hospedadora cuando se produce un ataque herbívoro.¹²⁷

Los monoterpenos, actúan como fumigantes debido a su volatilidad. Por ejemplo, el carvacrol es un compuesto fumigante que presenta un amplio espectro de actividad insecticida.¹²⁸ En un estudio de relaciones de estructura-actividad de monoterpenos y actividad fumigante frente a *Acanthoscelides obectus*, las estructuras oxigenadas resultaron ser las más activas, especialmente carvacrol, linanol y terpineol.¹²⁹ Así mismo, el monoterpeno fenchona ha resultado tener efectos fumigantes en plagas de coleópteros frecuentes en productos almacenados.¹³⁰

Teniendo en cuenta los estudios de actividad biológica realizados con compuestos similares al producto **14**, cabe esperar su efecto insecticida. Sin embargo, dado que en los resultados obtenidos la actividad antialimentaria observada es moderada con *S. littoralis* y nula con *M. persicae*, queda patente el hecho de que es necesario realizar más estudios para verificar actividad plaguicida de este compuesto.

También hay que añadir la baja toxicidad con células de mamífero, así como la ausencia de fitotoxicidad, que unido a la actividad insecticida lo convierten en un buen candidato como plaguicida de origen natural.

Diterpenos

El ácido dehidroabiético (**15**) ha sido aislado de la fracción 10-11, de la primera cromatografía realizada sobre el extracto crudo de ajenojo. Este compuesto ha sido identificado anteriormente en numerosas plantas principalmente del género *Pinus*, entre

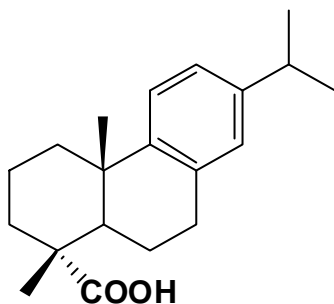
¹²⁷ Lewinsohn, E., Gijzen, M., Muzika, R.M., Burton, K., Croteau, R., (1993). Oleoresinosis in grand fir (*Abies grandis*) saplings and mature trees: Modulation of this wound response by light and water stresses. Pl. Physiol. 101: 1021-1028.

¹²⁸ Ahn, Y.J., Lee, S.B., Lee, H.S., Kim, G.H. (1998). Insecticidal and acaricidal activity of carvacrol and β -thujaplicine derived from *Thujopsis dolabrata* var *bondai* sawdust. J.Chem. Ecol. 24:81-90.

¹²⁹ Regnault-Roger, C., Hamraoui, A. (1995). Fumigant activity and reproductive inhibition induced by monoterpenes on *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera), a bruchid of kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) J. Stored Prod. Res. 31: 291-299.

¹³⁰ Kim, D.H., Ahn, Y.J. (2001) Contact and fumigant activities of constituents of *Foeniculum vulgare* fruit against three coleopteran stored-product insect. Pest Manag. Sci. 57: 301-306.

las que podemos citar *Pinus palustris*, *Pinus caribea*¹³¹ *Pinus taeda*,¹³² *Larix kaempferi*,¹³³ *Calceolaria pinifolia*,¹³⁴ entre otras.



Este compuesto presenta actividad antibacteriana,^{134,135} y en algunos de sus derivados se ha observado actividad citotóxica.¹³⁶

Debido a la escasa cantidad aislada de este compuesto (**15**), no se han podido realizar con él los ensayos de actividad biológica. En relación a la actividad citotóxica que presentan algunos de sus derivados, cabe pensar que este compuesto pueda tener efectos citotóxicos, los cuales contribuirían actividad demostrada por el extracto crudo sobre células de mamífero. En cualquier caso, sería necesario realizar los ensayos pertinentes para comprobarlo.

Triterpenos:

Los triterpenos presentes en este grupo proceden del fraccionamiento biodirigido de la fracción 10-11, obtenida del extracto crudo con n-hexn/EtOAc 75:25.

¹³¹ Bain, J.P. (1942) Resin Acids from Pine Tar. J.Am.Chem.Soc. 64: 871.

¹³² Carvalho, M.G., Rumjanek, V.M., Lopes, M.J.S., Carvalho, A.G. (1998). Diterpenes from *Pinus taeda*. Phytochemistry. 49: 1101-1105.

¹³³ Tanaka, R., Ohtsu, H., Matsunaga, S. (1997). Abietane diterpene acids and other constituents from the leaves of *Larix kaempferi*. Phytochemistry. 46: 1051-1057.

¹³⁴ Woldemichael, G.M., Wachter, G., Singh, M.P., Maiese, W.M., Timmerann, B.N. (2003). Antibacterial diterpenes from *Calceolaria pinifolia*. J. Nat. Prod. 66: 242-246.

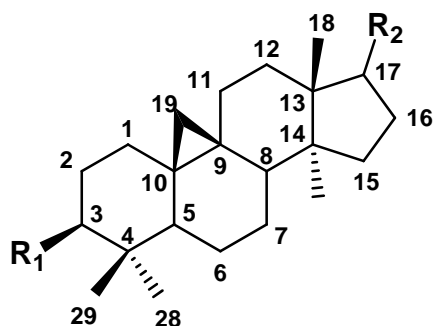
¹³⁵ Gigante, B., Silva, A.M., Marceo-Curto, M.J., Feio, S.S., Roseiro, J., Rels, L.V. (2002). Structural effects on the bioactivity of dehydroabietic acid derivatives. Planta med. 68: 680-684.

¹³⁶ Zaidi, S., Awale, S., Kalauni, S.K., Tezuka, Y., Esumi, H., Kadota, S. (2006). Diterpenes from *Pini resina* and their preferential cytotoxic activity under nutrient-deprived condition. 72: 1231-1234.

Este grupo de compuestos, también denominados fitosteroles, son triterpenos tetracíclicos con esqueleto de tipo cicloartano, los cuales se biosintetizan en las plantas a partir del cicloartenol, procedente de la ciclación del escualeno.¹³⁷

Entre los compuestos aislados encontramos:

- 24-Metilencicloartanol (**16**): 4,4-14 α -trimetil-9 β ,19ciclo-5 α -ergot-24(28)-en-3 β -ol
- Acetato de 24-metilencicloartanol (**17**)”
- Lagerenol (**18**): 3 β -hidroxi-cycloartan-24-ona
- Acetato de lagerenol (**19**)
- Cicloart-23-Z-ene-3 β -25 diol (6Aa97) (**20**)



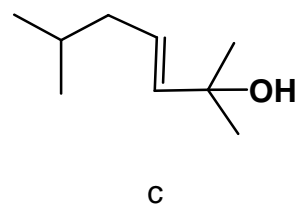
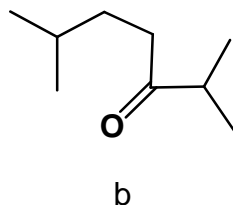
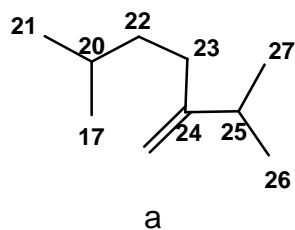
16 R₁= OH R₂=a

17 R₁= OAc R₂=a

18 R₁= OH R₂=b

19 R₁= OAc R₂=b

20 R₁= OH R₂=c



El compuesto **16** es un esteroles muy frecuente en el tejido fotosintético de plantas superiores e interviene en la biosíntesis de los fitosteroles.¹³⁸ Este compuesto ha sido utilizado para estudios quimiotaxonómicos de la familia Euphorbiaceae.¹³⁹

¹³⁷ Schaller, H. (2003) The role of sterols in plant growth and development. Prog. Lipid Res. 42: 163-175.

¹³⁸ Piironen, V., Lindsay, D.G., Miettinen, T.A., Toivo, J., Lampi, A-M. (2000). Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. J. Sci. Food Agr. 80: 939-966.

¹³⁹ Ponsinet, G. Ourisson, G. (1968). Études chimiotaxonómiques dans la famille des euphorbiacées -III Répartition des triterpènes dans les latex d'*Euphorbia*. Phytochemistry. 7: 89-98.

Tanto el compuesto **16** como su acetato (**17**), se han encontrado en la parte aérea y el látex de *Euphorbia broteri*, respectivamente.¹⁴⁰ Además el compuesto **16**, junto con el cicloartenol son los triterpenos mayoritarios del aceite de salvado de arroz.¹⁴¹

Por otro lado, tanto el compuesto **18** como su acetato (**19**) han sido aislados de *Lagerstroemia lancasteri* (Lythraceae).¹⁴² Además, el compuesto **18** también se ha encontrado en *Juncus effusus* (Juncaceae),¹⁴³ planta usada en la medicina tradicional China como antipirético, mientras que su acetato (**19**) se ha aislado de *Lagerstroemia speciosa*, planta usada en la medicina tradicional filipina como diurético, descongestionante y antidiabético.¹⁴⁴ El compuesto **20** ha sido aislado de *Juncus effusus*,¹⁴³ *Guarea trichilodes* (Meliaceae),¹⁴⁵ *Amberboa ramosa* (Asteraceae)¹⁴⁶ y *Trichilia dregeana* (Meliaceae)¹⁴⁷ entre otras especies.

A continuación (tablas 25, 26 y 27), se presentan los ensayos de actividad biológica llevados a cabo con este grupo de cicloartanos.

Tabla 25. Ensayos de actividad leishmanicida, tripanocida y citotoxicidad sobre células de mamífero (CHO) (ED₅₀, µg/ml).

Compuesto	CHO	<i>L. infantum</i>	<i>T. cruzi</i>
16	>100	≈ 100	>100
17	>100	>100	>100
18	15.7 (15.6, 15.9)	15.8 (12, 20.7)	51.1 (43.4, 60)
19	>100	≈ 100	>100
20	>100	>100	>100

ED₅₀: dosis capaz de producir un 50% de actividad.

¹⁴⁰ De Pascual Teresa, J., Urones, J.G., Marcos, I.S., Basabe, P., Sexmer Cadrado, M^a. J., Fernández Moro, R. (1987). Triterpenes from *Euphorbia broteri*. Phytochemistry. 26: 1767-1776.

¹⁴¹ Itoh, T., Tamura, T., Matsumoto, T. (1973) J.Am.Oil Chem. Soc. 50, 300.

¹⁴² Talapatra, B., Chaudhuri, P.K., Mallik, A.K., Talapatra, S.K. (1983). Lagerenyl acetate and lagerenol, two tetracyclic triterpenoids with the cycloartane skeleton from *Lagerstroemia lancasteri*. Phytochemistry. 22: 2559-2562.

¹⁴³ Della Greca, M., Fiorentino, A., Monaco, P., Previtera, L. (1994). Cycloartane triterpenes from *Juncus effusus*. Phytochemistry. 35: 1017-1022.

¹⁴⁴ Ragasa, C.Y., Ngo, H.T., Rideout, J.A. (2005). Terpenoids and sterols from *Lagerstroemia speciosa*. J. Asian Nat. Prod. Res. 7: 7-12.

¹⁴⁵ Furlan, M., Roque, N.F., Filho, W.W. (1993) Cycloartane derivatives from *Guarea trichiloides*. Phytochemistry. 32: 1519-1522.

¹⁴⁶ Khan, M.T.H., Khan, S.B., Ather, A., (2006). Tyrosinase inhibitory cycloartane type triterpenoids from the methanol extract of the whole plant of *Amberboa ramosa* Jafri and their structure-activity relationship. Bioorgan. Med. Chem. 14: 938-943.

¹⁴⁷ Eldeen, I.M.S., Van Heerden, F.R., Van Staden, J. (2007). Biological activities of cycloart-23-ene-3,25-diol isolated from the leaves of *Trichilia dregeana*. S. Afr. J.Bot. 73: 366-371.

De los cinco triterpenos, el único que ha resultado tener actividad antiparasitaria ha sido el compuesto **18**, aunque mostrando también una elevada citotoxicidad en células de mamífero. Dicha actividad ha sido mayor en *L. infantum* ($ED_{50}=15.8 \mu\text{g/ml}$) que en *T. cruzi* ($ED_{50}=51.1 \mu\text{g/ml}$), mientras que la toxicidad sobre células CHO prácticamente coincide con los resultados para *Leishmania*. Los demás compuestos del grupo no han presentado actividad antiparasitaria ni citotóxica con células de mamífero, ya que los valores de ED_{50} han sido superiores o iguales a $100 \mu\text{g/ml}$ en todos los casos.

En la tabla 26 se muestran los ensayos de citotoxicidad con células de ovario de *S. frugiperda* (Sf9) y la actividad alimentaria postingestiva así como la toxicidad con larvas de *S. littoralis*.

Tabla 26. Efectos tóxicos sobre *S. littoralis* (canulación oral, $40 \mu\text{g/larva}$) y ensayos de citotoxicidad con células de insecto ($ED_{50} \mu\text{g/ml}$).

Compuesto	Citotoxicidad <i>S. littoralis</i>		
	Sf9	ΔB^a	ΔI^b
16	53 (41.2, 68.1)	104	98
17	>100	75* pANCOVA2=0.46	83*
18	>100	107	102
19	>100	125	110
20	>100	ne	ne

*Indica diferencias significativas respecto al control ($p<0.05$). **ne**: no se realizó el ensayo. ^aCrecimiento relativo expresado con % del control (ΔB =variación del peso del insecto en mg). ^bConsumo relativo expresado como % del control (ΔI = mg de alimento consumido).

En los ensayos con larvas de *S. littoralis* cabe destacar el triterpeno **17**, que ha producido una actividad antialimentaria postingestiva moderada (ANCOVA 1, $p<0.05$) aunque no estuvo acompañado de toxicidad (ANCOVA 2, $p>0.05$). La disminución observada del peso de las larvas ha sido consecuencia de una disminución de la ingesta (tabla 26).

Por otro lado, la citotoxicidad observada con células de insecto fue selectiva para el triterpeno **16**, con un valor de $ED_{50}=53 \mu\text{g/ml}$ que nos indica que la toxicidad fue moderada. Este compuesto no tiene actividad antialimentaria ni efectos tóxicos

postingestivos, aunque si presenta citotoxicidad con células de insecto, lo cual puede ser debido al sistema de detoxificación de *S. littoralis* que evade los efectos citotóxicos de este compuesto (tabla 26).

Los datos obtenidos en la tabla 27 indican que este grupo de fitosteroles no inhiben el asentamiento con áfidos de la especie *M. persicae* ni presentan actividad fagorrepelente con larvas de *S. littoralis*. Dichos datos indican que el porcentaje de inhibición del asentamiento (SI) de *M. persicae* no ha presentado unos valores estadísticamente significativos en ninguno de los casos y el porcentaje de inhibición de la alimentación (FR) de las larvas de *Spodoptera* no ha superado el 70%.

En este caso, dada la escasa cantidad de producto disponible y la ausencia de actividad antialimentaria con áfidos de la especie *M. persicae*, no se han realizado ensayos con la *R. padi*.

Tabla 27. Actividad antialimentaria de los triterpenos frente a *M. persicae* y *S. littoralis* (dosis 50 µg/cm²)

Compuesto	<i>M. persicae</i>		<i>S. littoralis</i>	
	%SI ^a	%T ^b	%C ^c	%FR ^d
16	20.7	53 ± 24	47 ± 24	0
17	ne	ne	ne	ne
18	28.8	46 ± 22	54 ± 22	23 ± 21
19	25.6	46 ± 22	54 ± 22	34 ± 41
20	ne	ne	ne	ne

^aPorcentaje de inhibición del asentamiento; ^bPorcentaje de pulgones asentados en el tratamiento; ^cPorcentaje de pulgones asentados en el control; ^dPorcentaje de inhibición de la alimentación; *Indica diferencias significativas respecto al control ($p < 0.05$). **EC₅₀**: dosis capaz de producir un 50% de actividad. **ne**: no se realizó el ensayo.

En cuanto a las pruebas de fitotoxicidad de los triterpenos tetracíclicos aislados de *A. absinthium* con semillas de *L. sativa*, no se ha observado ningún efecto, ya sea en cuanto a la germinación como en cuanto a la variación de longitud radicular. En ninguno de los casos, los resultados presentaron diferencias significativas con el control (resultados no presentados).

De forma general, en todos los organismos eucariotas, los esteroides juegan un papel muy importante como componentes estructurales de las membranas y como

precusores de hormonas esteroideas.¹³⁷ Su función principal es controlar la fluidez y permeabilidad de la membrana, aunque algunos tienen funciones específicas en la transducción de señales.

Existe un interés considerable en la biosíntesis y funciones de los esteroides como diana terapéutica frente a *T. cruzi* y *Leishmania* spp.¹⁴⁸ Estos parásitos requieren ergosterol y esteroides alquilados en la posición 24, al contrario que las células de los vertebrados, que requieren colesterol. Los inhibidores de la síntesis de los esteroides son potenciales agentes tripanocidas y leishmanicidas,¹⁴⁹ destacando los inhibidores de la enzima 24-metil transferasa (24-SMT), que producen una inhibición selectiva entre mamíferos y parásitos.¹⁵⁰ Por otro lado, los insectos, incapaces de sintetizar el núcleo esteroideal, dependen de una fuente exógena de esteroides.

En cuanto a los cicloartanos, hay que destacar su papel como intermediarios en la biosíntesis de fitosteroides,¹³⁸ así como su amplio rango de actividades biológicas. El fitosterol **20** presenta propiedades antiinflamatorias, lo cual explica el uso en medicina tradicional de dos de las especies de donde se ha aislado, *Trichilia dregeana* y *Juncus effusus*.

Por otro lado, el compuesto **16**, así como otros fitosteroides aislados de *Aloe vera*, ha resultado tener actividad antidiabética en ratones.¹⁵¹

Cabe destacar la actividad citotóxica con líneas tumorales de los cicloartanos aislados de *Combretum quadrangulare* y *Cimicifuga foetida*.^{152,153} También se han observado

¹⁴⁸ Liendo, A., Visbal, G., Piras, M.M., Piras, R., Urbina, J.A., (1999). Sterol composition and biosynthesis in *Trypanosoma cruzi* amastigotes. Mol. Biochem. Parasit. 104: 81-91.

¹⁴⁹ Urbina, J.A. (1991). Lipid biosynthesis pathways as chemotherapeutic targets in kinetoplastid parasites. Parasitology, 114 (SUPPL. 1). S91-S99.

¹⁵⁰ Magaraci, F., Jimenez Jimenez, C., Rodrigues, C., Rodrigues, J.C.F., Braga, M.V., Yardley, V., et al. (2003). Azasterols as Inhibitors of Sterol 24-methyltransferase in *Leishmania* Species and *Trypanosoma cruzi*. J. Med. Chem. 46: 4714-4727.

¹⁵¹ Tanaka, M., Misawa, E., Ito, Y., Habara, N., Nomaguchi, K., et al. (2006). Identification of Five Phytosterols from *Aloe vera* gel as Anti-diabetic Compounds. Biol. Pharm. Bull. 7: 1418-1422.

¹⁵² Banskota, A.H., Tezuka, Y., Phung, L.K., Tran, K.Q., Saiki, I., Miwa, Y., Taga, T., Kadota, S., (1998) Cytotoxic cycloartane-type triterpenes from *Combretum quadrangulare*. Bioorgan. Med. Chem. Lett. 9: 3519-3524.

¹⁵³ Tian, Z., Pan, R.L., Si, J.Y., Xiao. (2006). Cytotoxicity of cycloartane triterpenoids from aerial part of *Cimicifuga foetida*. Fitoterapia. 77: 39-42.

efectos quimiopreventivos del cáncer con compuestos de tipo cicloartano de origen natural y semisintético, entre los que se encuentran el triterpeno **16** y el **18**.¹⁵⁴

Dentro de los glicósidos aislados de las especies del género *Thalictrum*, hay una serie de compuestos de tipo cicloartano que presentan actividad en el test de transformación de linfocitos (LTT). Además el Thalicósido A2 tiene actividad inhibidora frente a *Candida albicans* y *Staphylococcus aureus*.¹⁵⁵

También hay que destacar los cicloartano triterpeno glicósidos aislados de *Astragalus oleifolius*, que presentan actividad leishmanicida sobre amastigotes de *L. donovani*.¹⁵⁶

De los estudios de estructura-actividad de los esteroides con insectos, se ha detectado que algunos compuestos intermedios (9 β ,19-ciclosteroides) de la ruta biosintética de los esteroides, así como algunos productos finales ($\Delta^{23(24)}$, $\Delta^{25(25)}$ –olefinas) son perjudiciales para el desarrollo de los insectos.^{157,158}

Los fitosteroides estudiados del ajeno presentan actividad citotóxica y antiparasitaria selectiva (**18**), así como actividad postingestiva (**17**), siendo ausentes los efectos fagorepelentes y fitotóxicos con todos los compuestos del grupo.

En cuanto a la relación estructura actividad, la presencia de un OH en C-3 y la existencia de un carbonilo o un metileno en C-24 son determinantes para la actividad de este tipo de compuestos. La citotoxicidad con células de mamífero viene dada por la presencia de un grupo OH en C-3 y un carbonilo en C-24, mientras que en el caso de las células de insecto, la actividad se da únicamente con la presencia de un OH en C-3 y un

¹⁵⁴ Kikuchi, T., Akihisha, T., Tokuda, H., Ukiya, M., Watanabe, K., Nishino, H. (2007). Cancer Chemopreventive Effects of Cycloartane-Type and Related Triterpenoids in in Vitro and in Vivo Models. J. Nat. Prod. 70: 918-922.

¹⁵⁵ Khamidullina, E.A., Gromova, A.S., Lutsky, V.I., Owen, N.L. (2006). Natural products from medicinal plants: non-alkaloidal natural constituents of the *Thalictrum* species. Nat. Prod. Rep. 23: 117-129.

¹⁵⁶ Özipek, M., Dönmez, A.A., Çalis, I., Brun, R., Rüedi, P., Tasdemir, D. (2005). Leishmanicidal cycloartane-type triterpene glycosides from *Astragalus oleifolius*. Phytochemistry. 66: 1168-1173.

¹⁵⁷ Svoboda, J.A., Ross, S.A., Nes, W.D. (1995). Comparative studies of metabolism of 4-desmethyl, 4-monomethyl and 4,4- dimethyl sterols in *Manduca sexta*. Lipids. 30: 91-94.

¹⁵⁸ Nes, W.D., Lopez, M., Zhou, W., Guo, D.A., Dowd, P.F., Norton, R.A. (1997). Sterol utilization and metabolism by *Heliothis zea*. Lipids. 32: 1317-1323.

metileno en C-24. La actividad antialimentaria postingestiva tiene lugar con la presencia de un grupo acetato en C-3 y un metileno en C-24.

Nuestros resultados coinciden con los obtenidos por Mazoir *et al.*¹⁵⁹ con un grupo de triterpenos tetracíclicos en ensayos con *L. infantum* y *T. cruzi*, donde los mayores efectos se presentaron en los compuestos con un grupo OH/cetona en C-3 y un grupo cetona o epóxido en C-24. Este mismo grupo de compuestos presenta efectos fagorepelentes (*M. persicae*, *R. padi*), antialimentarios (*S. littoralis*) y fitotóxicos (*L. sativa*), contrastando con nuestros compuestos, que no tuvieron efectos con estas especies con la excepción del compuesto **17**.¹⁶⁰

Dada la estructura química de los compuestos de este grupo podemos pensar que el mecanismo de actividad que presentan está relacionado con una alteración de las rutas biosintéticas de los esteroides. Debido a las distintas demandas de esteroides por parte los organismos estudiados (células de insecto y mamífero, protozoos, insectos y semillas), cabe esperar que la actividad de los compuestos sea selectiva en función de la especie y tipo de tratamiento. De esta forma, encontramos que el fitosterol **18** es citotóxico con CHO y antiparasitario; el compuesto **16** es citotóxico con células de insecto (Sf9); y su acetato (**17**) presenta actividad antialimentaria postingestiva con larvas de *S. littoralis*.

Teniendo en cuenta que la actividad antiparasitaria del compuesto **18** ha venido acompañada de actividad citotóxica en células de mamífero, podemos pensar por un lado que la alteración de la biosíntesis de esteroides no está relacionada con la ruta del ergosterol (ya que esta ruta biosintética no aparece en células de mamífero); o por otro lado que la toxicidad en células y protozoos se ha producido por mecanismos diferentes.

Son necesarios estudios más completos para poder determinar a que nivel se está produciendo la alteración de la biosíntesis, que enzimas se inhiben, que productos se acumulan y cual es el mecanismo concreto de la actividad en cada caso.

¹⁵⁹ Mazoir, N. *et al.* Anti-leishmanial and anti-trypanosomal activity of triterpene derivatives from latex of two *Euphorbia* species. (en preparación).

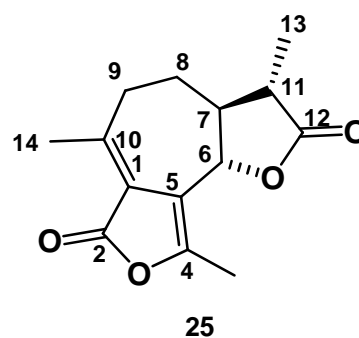
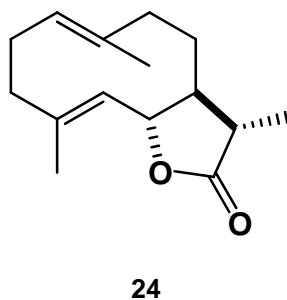
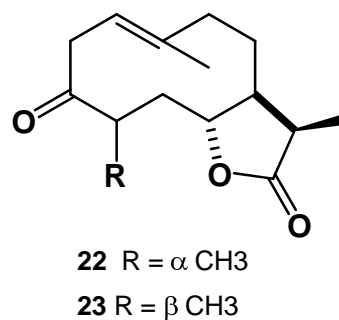
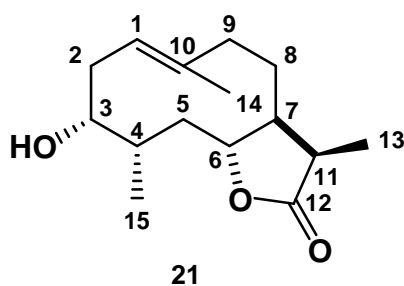
¹⁶⁰ Mazoir, N., Benharref, A., Bailén, M., Reina, M., González-Coloma, A. (2008). Bioactive triterpene derivatives from latex of two *Euphorbia* species. *Phytochemistry*. 69: 1328-1338.

Sesquiterpenos

Las lactonas sesquiterpénicas han sido aisladas de las fracciones 10-11 y 14 (n-Hexn-EtOAc, 75:25) procedentes de la primera VLC realizada sobre el extracto crudo de *A. absinthium*, mediante fraccionamiento biodirigido. Dentro de este grupo hemos incluido la estructura dimérica de una sesquiterpeno lactona que ha sido aislada de la fracción 23-24 de la primera VLC, a una polaridad de EtOAc del 100%.

Los compuestos aislados han sido los siguientes:

- Hidroxipelenólido (**21**)
- Cetopelenólido A (**22**)
- Cetopelenólido B (**23**)
- Hihidrocostunolida (**24**)
- Absilactona (**25**)



Los compuestos **21**, **22** y **23** son germacranólidos, aislados anteriormente de *Artemisia absinthium*.¹⁶¹ Además el compuesto **23** también ha sido identificado en la parte aérea de *Ajania fruticulosa*¹⁶² y *Pyrethrum santolionoides*.¹⁶³

Por otro lado, el producto **24** se ha aislado de raíces de *Saussurea lappa*,¹⁶⁴ y de parte aérea de *Artemisia inculta*¹⁶⁵ y *Conocephalum japonicum*.¹⁶⁶ También se puede obtener por semisíntesis, mediante deshidrogenación del sesquiterpeno costunolida^{167,168} (aislado de *Saussurea lappa*).

La absilactona es una nueva *nor*-lactona sesquiterpénica **25**, cuya estructura hemos determinado como **25**, basándonos en las siguientes consideraciones. El espectro de masas de alta resolución del compuesto mostró el ión molecular a 248.1040 m/z, que corresponde a la fórmula C₁₄H₁₆O₄.

En su espectro de ¹H-RMN observamos como señales más destacadas la presencia de tres metilos, dos de los cuales están sobre doble enlace, resonando como singuletes a poco mas de 2.23 y 2.36 δ, mientras que el tercero corresponde a un metilo secundario que aparece como un doblete a 1.25 δ (J = 7 Hz). A campo mas bajo 4.83 δ resuena el protón geminal al cierre lactónico. Sus constantes de acoplamiento, 10.6 y 1.6 Hz, indicaron una β- estereoquímica para este hidrógeno.

¹⁶¹ Herout, V., Sorm, F., (1956) Collect. Czech. Chem. Commun. 21:1485,1491.

¹⁶² Adekenov, S.M., Kulyjasov, A.T., Radulgin, V.A., Bagryanskaya, I.Y., Gatilov, Y.V., Shakiro, M.M. (1998). Chemistry of natural compounds and bioorganic chemistry: Ajanolide A, a new germacranolide from *Ajania fruticulosa*. Russ, Chem. BI. 47: 169-172.

¹⁶³ Mahmoud, A.A., Ahmed, A.A., Iinuma, M., Tanaka, T. (1994). 2,3-Secogermacranolides and germacranolides from *Pyrethrum santolionoides*. Phytochemistry. 36: 393-339.

¹⁶⁴ Sun, C.M., Syu, W.J., Don, M.J., Lu, J.J., Lee, G.H. (2003). Cytotoxic sesquiterpene lactones from the root of *Saussurea lappa*. J. Nat. Prod. 66: 1175-1180.

¹⁶⁵ Marco, J.A., Sanz-Cervera, J.F., Garcia-Lliso, V., Guara, M., Valles-Xiral, J. (1997). Sesquiterpene lactones from *Artemisia inculta*. Phytochemistry. 45: 751-754.

¹⁶⁶ Toyota, M., Asakawa, Y. (1993). Sesqui-and triterpenoids of the liverwort, *Conocephalum japonicum*. Phytochemistry. 32:1235-1238.

¹⁶⁷ Macías, F.A., Galindo, J.C.G., Castellano, D., Velasco, R.F. (1999). Sesquiterpene lactones with potencial use as natural herbicide models (I): trans, trans-germacranolides. J.Agric. Food Chem. 47: 4407-4414.

¹⁶⁸ Barrero, A., Oltra, J.E., Cuerva, J.M., Rosales, A. (2002). Effects of solvents and water in Ti(III)-mediated radical cyclizations of epoxygermacrolides. Straightforward synthesis and absolute stereochemistry of (+)-3α-hydroxyreynosin and related eudesmanolides. J.Org.Chem. 67: 2466-2571.

Tabla 28. Datos de ^{13}C - RMN del compuesto **25**.

carbono	25	carbono	25
1	121.2	9	37.6
2	166.8	10	154.4
4	149.0	11	41.5
5	111.6	12	177.6
6	78.3	13	12.4
7	49.0	14	22.6
8	26.0	15	13.5

El espectro de ^{13}C -RMN (tabla 28) presenta, además de los grupos metilo, dos grupos metileno 26.0 y 37.6, el valor relativamente bajo del primero es típico de tener en las posiciones a de un anillo, otro metileno y un metino, por lo que fue asignado a C-8. El grupo metino en C-11 se observa a 41.5 δ . Otras señales observadas en este espectro fueron seis singuletes, dos de ellos a 166.8 y 177.6 δ , característicos del grupo éster y de la lactona, respectivamente, mientras que los otros cuatro singuletes corresponden a los carbonos de los dos dobles enlaces tetrasustituídos.

La estructura relativa propuesta para este compuesto se confirmó mediante el estudio de los espectros de RMN bidimensionales. Así, en el experimento HMBC destacaron las siguientes correlaciones: H-6 con C-4, C-5 y C-8; H-7 con C-6; H-8 con C-6, C-7, C-9 y C-10; H-9 con C-7, C-8, C-10 y C-1; H-11 con C-7, C-8, C-12 y C-13; H-13 con C-7, C-11 y C-12; H-14 con C-1, C-9 y C-10; H-15 con C-4 y C-5. El experimento NOESY permitió determinar la estereoquímica de H-11 como β , pues este hidrógeno correlaciona con H-6 y H-8 β . Otras conectividades observadas fueron H-13 α con H-7 α , H-8 α y H-11 β ; H-8 α con H-9 β .

A continuación (tablas 29, 30 y 31) se exponen los resultados de los ensayos de actividad biológica realizados con este grupo de sesquiterpenos.

Este grupo de compuestos no presenta actividad antiparasitaria con los protozoos *Leishmania infantum* y *Trypanosoma cruzi* ni citotóxica con células de mamífero (CHO), dado que en ninguno de los casos se han obtenido valores de ED_{50} inferiores a 100 $\mu\text{g/ml}$ (datos no presentados).

En cuanto a la citotoxicidad con células de insecto (Sf9) (tabla 29), cabe destacar la elevada actividad de los productos **25** ($ED_{50}=5.6 \mu\text{g/ml}$) y **21** ($ED_{50}=29.5 \mu\text{g/ml}$), seguidas del producto **22** ($ED_{50}=62 \mu\text{g/ml}$), en cuyo caso fue moderada. Además hay que destacar que ninguno de los tres compuestos presentó toxicidad con células de mamífero. Por el contrario, ni el producto **21** ni el **25** produjeron toxicidad o actividad antialimentaria postingestivas con larvas de *S. littoralis*, lo que puede ser debido al sistema metabólico de estos insectos que los inactiva o elimina antes de que puedan producirla.

Tabla 29. Efectos tóxicos sobre *S. littoralis* (canulación oral, 40 $\mu\text{g/larva}$) y ensayos de citotoxicidad con células de *S. frugiperda* ($ED_{50} \mu\text{g/ml}$).

Compuesto	Citotoxicidad	<i>S. littoralis</i>	
	Sf9 ^a	ΔB^b	ΔI^c
21	29.5 (19.2, 45.5)	97	94
22	62 (34.5, 91.4)	128** pANCOVA2=0.007	112*
23	>100	nc	nc
24	>100	92	92
25	5.6 (2.9, 10.8)	91	92

*Indica diferencias significativas respecto al control ($p<0.05$). **nc**: no se realizó el ensayo. ^aCélulas de ovario de *Spodoptera frugiperda*. ^bCrecimiento relativo expresado con % del control (ΔB =variación del peso del insecto en mg). ^cConsumo relativo expresado como % del control (ΔI = mg de alimento consumido).

El único efecto observado con *S. littoralis* ha sido el aumento de peso de las larvas provocado por el compuesto **22**. El aumento de peso ha venido acompañado de un aumento de la ingesta (ANCOVA1 $p<0.05$), siendo mayor de lo que cabría esperar por la ingesta realizada (ANCOVA 2 $p=0.007$). Esto puede ser debido a una alteración metabólica.

Tabla 30. Actividad antialimentaria frente a diversos insectos diana (dosis 50 µg/cm²)

Compuesto	<i>R. padi</i>			<i>M. persicae</i>			<i>S. littoralis</i>
	%SI ^a /EC ₅₀	%T ^b	%C ^c	%SI ^a /EC ₅₀	%T ^b	%C ^c	%FR ^d
21	34.4	43 ± 17	57 ± 17	64.5* 16.5 (9, 30.2)	23 ± 18	77 ± 18	42* ± 28
22	87.1* 1.1 (0.4, 3.5)	9 ± 14	91 ± 14	41.6*	38 ± 22	62 ± 22	50 ± 40
23	ne	ne	ne	35.8*	37 ± 17	63 ± 17	35* ± 21
24	ne	ne	ne	14.4	52 ± 15	48 ± 15	59* ± 35

^aPorcentaje de inhibición del asentamiento; ^bPorcentaje de pulgones asentados en el tratamiento; ^cPorcentaje de pulgones asentados en el control; ^dPorcentaje de inhibición de la alimentación; *Indica diferencias significativas respecto al control (p<0.05). EC₅₀: dosis capaz de producir un 50% de actividad. ne: no se realizó el ensayo.

En cuanto a los ensayos realizados con pulgones (tabla 30), solo la lactona **21** ha presentado una elevada actividad con la especie *M. persicae*, con un porcentaje de inhibición del asentamiento de 64.5 y una EC₅₀ de 16.5 µg/cm², aunque sin actividad con *R. padi*. Por otro lado, cabe destacar al compuesto **22** con un porcentaje de inhibición del asentamiento con *R. padi* (SI) de 87.1% y una ED₅₀ de 1.12 µg/cm²; sin embargo, la actividad con *M. persicae* no ha sido tan elevada, con un porcentaje de inhibición del asentamiento (SI) de 41.6%.

Dados los resultados obtenidos con *M. persicae* y debido a las escasas cantidades de producto aisladas solo se realizó el ensayo con *R. padi* con los productos **23** y **24**.

Con las larvas de *S. littoralis* solo se obtuvieron efectos antialimentarios moderados: **25**>**22**>**21** con un porcentaje de 59, 50 y 42% respectivamente.

Tabla 31. Efectos fitotóxicos germinativos y de vigor con semillas de *L. sativa* (dosis 100 µg/cm²), expresados como % del control.

Compuesto	Germinación		Longitud radicular
	24h	48h	
21	99	100	89*
22	99	100	95
24	100	100	72*
25	100	100	110

*Indica diferencias significativas respecto al control (p<0.05).

Por último, no se han observado efectos en la germinación de las semillas de *L. sativa*, como se muestra en la tabla 31; y en cuanto a la variación de la longitud radicular sí aparecen efectos, aunque moderados, con los productos **24** y **21** con unos porcentajes de longitud radicular con respecto del control de 72 y 89% respectivamente.

Las lactonas sesquiterpénicas son compuestos característicos de la familia de las Asteráceas. Son sustancias amargas, relativamente estables y de carácter lipófilo, derivados del trans, trans farnesil pirofosfato.¹⁶⁹ Muchos de estos compuestos presentan una γ -lactona α,β -insaturada, asociada a un grupo metilénico exocíclico que parece ser responsable de la actividad antitumoral, citotóxica, antimicrobiana, insecticida y fitotóxica de estos compuestos. La actividad inhibidora de estos compuestos se produce mediante una alquilación selectiva de grupos sulfidrilo proteicos por adición de Michael. Esta reacción se debe a la presencia de grupos funcionales electrófilos, que permiten la reactividad del compuesto frente a nucleófilos biológicos.¹⁷⁰

Entre los compuestos descritos de este tipo con actividad citotóxica podemos encontrar partenolida (*Ambrosia confertiflora*),¹⁷¹ aromaticina (*Helenium aromaticum*), vernoleptina (*Vernonia hymenolepsis*),¹⁷² entre muchos otros.

En cuanto a los efectos citotóxicos de los sesquiterpenos aislados sobre células de insecto (Sf9), hemos observado que la mayor actividad aparece en el único compuesto del grupo con γ -lactona α,β -insaturada (**25**). La actividad de los germacranólidos es mayor con la presencia de un grupo hidroxilo en el carbono 3 (compuesto **21**) y disminuye cuando el C-3 se oxida a cetona (**22**); perdiéndose por completo la actividad cuando además del grupo oxo en C-3, el metilo en C-14 presenta una conformación β (**23**).

¹⁶⁹ Geissman, T.A. (1973). Terpenoids: Structures, biogenesis and distribution. Recent Adv. Phytochem. (Runeckles, V., ed.). 6: 65-94.

¹⁷⁰ Rodríguez, E., Towers, G.H.N. (1976). Biological activities of sesquiterpene lactones. Phytochemistry. 15: 1573-1580.

¹⁷¹ Lee, K.H., Huang, E.S., Piantadosi, C., Pagano, J. S., Geissman, T.A. (1971). Cytotoxicity of sesquiterpene lactones. Cancer Res. 31: 1649.

¹⁷² Kupchan, S.M., Eakin, M.A., Thomas, A.M. (1971). Tumor inhibitors. 69. Structure-cytotoxicity relationships among the sesquiterpene lactones. J. Med. Chem. 14: 1147.

Por otro lado, los efectos que producen estos compuestos frente a insectos son variados, y sugieren una evolución en plantas como productos disuasorios de insectos herbívoros. Entre los efectos descritos encontramos actividad antialimentaria, disuasión a la oviposición, inhibición del crecimiento, alteraciones del desarrollo y mortalidad.¹⁷³

La partenina, principal metabolito secundario de *Parthenium hysterophorus*, así como varios de sus derivados, presenta actividad antialimentaria frente a varias especies de insectos, además de actividad nematicida y herbicida.¹⁷⁴

En cuanto a los sesquiterpenos de este grupo, la actividad ha sido nula o baja con lepidópteros de la especie *S. littoralis*, tanto en cuanto a la actividad antialimentaria como a la toxicidad postingestiva. Por el contrario, en los ensayos con áfidos, la actividad es elevada aunque únicamente se da en germacranólidos, existiendo una especificidad de acción según la presencia de un grupo hidroxilo o cetona en el C-3. El hidroxilo en C-3 favorece la actividad frente a *M. persicae*, mientras que la presencia de un grupo oxo en C-3 la favorece frente a *R. padi*.

Existen numerosas lactonas sesquiterpénicas descritas como agentes alelopáticos en muchas plantas de la familia de las Compuestas.¹⁷⁵ El compuesto **24** y sus derivados epoxicostunolida, costunolida o epoxipartenolida, entre otros, presentan actividad alelopática con semillas de *L. sativa*, *Lepidium sativum*, *Allium cepa* y *Triticum aestivum*.¹⁶⁷ Además, el compuesto **24** presenta citotoxicidad con varias líneas tumorales¹⁶⁴ y tiene propiedades antibacterianas con varias especies de *Mycobacterium*.¹⁷⁶ Sin embargo en nuestros ensayos este compuesto no ha presentado actividad citotóxica con ninguna de las dos líneas celulares utilizadas, sino únicamente fitotóxica, inhibiendo la longitud radicular de *L. sativa*. Estos datos concuerdan con los resultados obtenidos por Macías *et al.*,¹⁶⁷ que además indican que la presencia de la γ -lactona es necesaria para la actividad y

¹⁷³ Picman, A.K. (1986). Biological activities of sesquiterpene lactones. *Biochem. Syst. Ecol.* 14: 255-281.

¹⁷⁴ Datta, S., Saxena, D.B. (2001). Pesticidal properties of parthenin (from *Parthenium hysterophorus*) and related compounds. *Pest Manag. Sci.* 57: 95-101.

¹⁷⁵ Spring, O., Albert, K., Grandmann, W. (1981). Annuithrin A, a new biologically active germacranolide from *Helianthus annuus*. *Phytochemistry*. 21: 1883-1885.

¹⁷⁶ Fischer, N.H., Lu, T., Cantrell, C.L., Castaneda-Acosta, J., Quijano, L., Franzblau, S.G. (1998). Antimycobacterial evaluation of germacranolides. *Phytochemistry*. 49: 559-564.

que la presencia de la insaturación de la lactona (α,β) disminuye el efecto de estos compuestos.

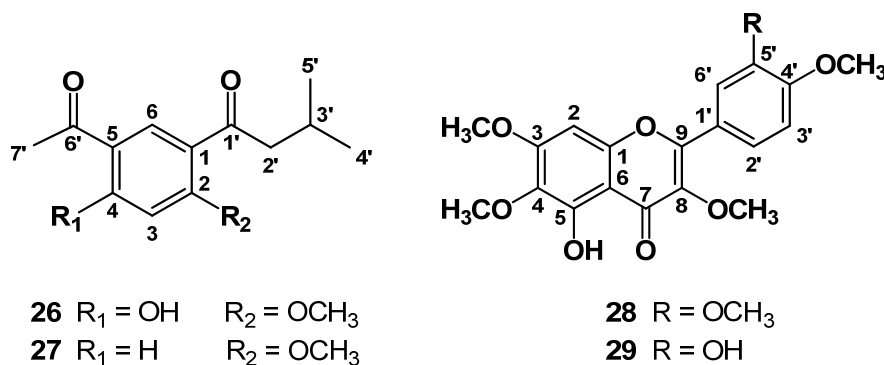
Según los resultados obtenidos en las pruebas de fitotoxicidad, la actividad inhibidora de la longitud radicular disminuye cuanto mayor es el grado de oxidación de la posición C-3. La actividad inhibidora es: **24**>**21**>**22**.

Teniendo en cuenta la estructura química de los sesquiterpenos de este grupo y los anteriores estudios sobre el mecanismo de acción de estos compuestos,^{167,170} podemos concluir que la presencia de una γ -lactona α,β -insaturada potencia la actividad citotóxica y su ausencia potencia la actividad alelopática. Así mismo, tanto el grado de oxidación de C-3 como la estereoquímica del carbono 14 en los germacranólidos, son determinantes para la actividad biológica de estos compuestos.

Dado que ninguno de ellos presenta un grupo metilénico exocíclico, y solo uno (**25**) presenta una γ -lactona α,β -insaturada, cabe esperar la nula o moderada actividad insecticida y citotóxica de estos compuestos.

2.2.2.2. Compuestos fenólicos

Los fenoles **26** y **27** han sido aislados de la fracción 10-11 y las flavonas **28** y **29** de las fracciones 13 y 14, todas ellas de la primera VLC realizada sobre el extracto crudo de *A. absinthium*.



El compuesto **27**, también conocido como espeletona, se ha identificado anteriormente en *Espeletia schultzii*,¹⁷⁷ *Babianthus viscidus*,¹⁷⁸ *Verbsina luetzelburgii*¹⁷⁹ y *Eupatorium aschenbornianum*.¹⁸⁰

En relación a los flavonoides **28** y **29**, conocidos como artemetina y casticina respectivamente, han sido aislados de numerosas especies, principalmente de los géneros *Artemisia* y *Vitex*, como es el caso de *Artemisia annua*,^{181,182} *Artemisia abrotanum*,¹⁸³ *Artemisia glabella*,¹⁸⁴ *Vitex negundo*¹⁸⁵ y *Vitex rotundifolia*,¹⁸⁶ entre otras. Además el compuesto **28** se ha descrito anteriormente en *A. absinthium*.¹⁸⁷

Otro de los productos que se aislaron (**26**) es nuevo en la bibliografía científica y lo hemos denominado artemol. Su estructura, 1-(5-acetil-2-hidroxi-4-metoxifenil)-3-metilbutan-1-ona (**26**), se asignó en base a los siguientes datos espectroscópicos. Su espectro de masas de alta resolución mostró el ión molecular a 250.1201 m/z, lo que corresponde a la fórmula molecular C₁₄H₁₈O₄. El espectro de RMN de hidrógeno mostró la resonancia de los dos protones aromáticos a 6.44 y 8.25 δ como singuletes, siendo este último el situado en posición orto con el grupo acetilo. Otras señales observadas fueron las de los dos grupos metilo de la cadena a 0.94 y 0.96 δ, mientras que el del grupo acetilo aparece a 2.81 δ y el correspondiente al metoxilo a 3.94 δ. A

¹⁷⁷ Bohlmann, F., Rao, N. (1973). Neue hydroxyacetophenon-derivate aus *Espeletia schultzii* Wedd. Chem. Ber. 106: 3035-3038.

¹⁷⁸ Bohlmann, F., Gupta, R., King, R.M., Robinson, H., (1981). A clerodane lactone and a tremetone derivative from *Babianthus viscidus*. Phytochemistry. 20: 331-332.

¹⁷⁹ Bohlmann, F., Grenz, M., Gupta, R., Dar, A.K., Ahmaed, M. (1980). Eudesmane derivatives from *Verbesina* species. Phytochemistry. 19: 2391-2398.

¹⁸⁰ Rios, M.Y., Aguilar-Guadarrama, A.B., Navarro, V. (2003). Two New Benzofuranes from *Eupatorium aschenbornianum* and their antimicrobial activity Planta Med. 69: 967-970.

¹⁸¹ Baeva, R.T., Nabizade, L.I., Zapesochaya, G.G., Karreyev, M.O. (1988). Flavonoids of *Artemisia annua*. Chem. Nat. Compd. 24: 256-267.

¹⁸² Zheng, G.Q. (1994). Cytotoxic terpenoids and flavonoids from *Artemisia annua*. Planta Med 60:54-57.

¹⁸³ Bergendorff, O., Sterner, O. (1995). Spasmolytic flavonols from *Artemisia abrotanum*. Planta. Med. 61: 370-371.

¹⁸⁴ Kul'magambetova, E.A., Pribytkova, L.N., Adekenov, S.M., (2000). Flavonoids of *Artemisia glabella*. Chem. Nat. Compd. 36: 95-96.

¹⁸⁵ Diaz, F., Chavez, D., Lee, D., Mi, Q., Chai, H.B., Tan, G.T., et.al. (2003). Cytotoxic flavone analogues of vitexicarpin, a constituent of the leaves of *Vitex negundo*. J.Nat. Prod. 66: 865-867.

¹⁸⁶ Ono, M., Yanaka, T., Yamamoto, M., Ito, Y., Nohara, T. (2002). New diterpenes and norditerpenes from the fruits of *Vitex rotundifolia*. J.Nat.Prod. 65: 537-541.

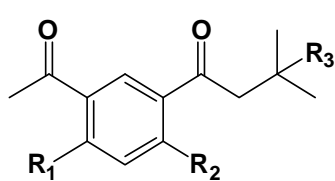
¹⁸⁷ Cekan, Z., Herout, V. (1956). Collect. Czech. Chem. Commun. 21: 79-80.

2.61 δ aparece un doblete correspondientes a un grupo metileno, situado en posición α a un grupo carbonilo, mientras que a 2.21 δ se observa un multiplete debida al grupo metino. El hidrógeno hidroxílico se muestra a 12.91 δ , indicando su desplazamiento químico que debe estar asociado por un puente de hidrógeno con un grupo carbonilo.

Tabla 32. Datos de ^{13}C - RMN del compuesto **26**.

carbono	26a	carbono	26a
1	114.2	1'	199.9
2	165.2	2'	53.1
3	100.2	3'	25.3
4	168.0	4'	23.1
5	121.4	5'	23.1
6	135.6	6'	203.8
OMe	56.3	7'	26.7

El espectro de ^{13}C -RMN (tabla 32) confirma la presencia del anillo aromático, con la resonancia de dos dobletes a 100.2 y 135.6, correspondiendo este último al situado en posición α al grupo acetilo, y de cuatro singuletes a 114.2, 121.4, 165.2 y 168.0 δ . Los dos últimos son los que portan los grupos metoxilo e hidroxilo, respectivamente. Los grupos carbonilo se muestran en este espectro a 199.9 y 203.8 δ , correspondiendo el último al del grupo acetilo. Estas asignaciones se realizaron en base al experimento HMBC. En el espectro NOESY se observaron como correlaciones principales la de H-3 con el grupo metoxilo (H-7') y las de H-6 con el grupo metilo del acetilo (H-7') y con el grupo metileno (H-2').

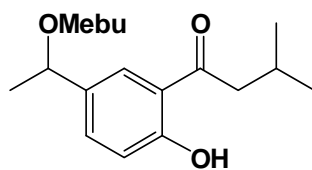


26a $\text{R}_1 = \text{OH}$ $\text{R}_2 = \text{OCH}_3$ $\text{R}_3 = \text{H}$

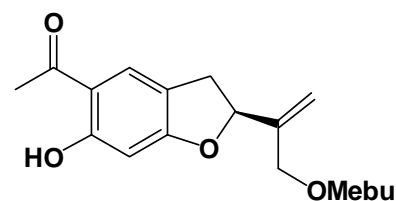
26b $\text{R}_1 = \text{OCH}_3$ $\text{R}_2 = \text{OH}$ $\text{R}_3 = \text{H}$

26e $\text{R}_1 = \text{OCH}_3$ $\text{R}_2 = \text{OH}$ $\text{R}_3 = \text{OH}$

26f $\text{R}_1 = \text{OH}$ $\text{R}_2 = \text{OCH}_3$ $\text{R}_3 = \text{H}$



26c



26d

Llegados a este punto, teníamos dos estructuras **26a** y **26b** que cumplieran con los datos indicados anteriormente. Finalmente, al artemol se le asignó la estructura **26a** atendiendo a la resonancia del hidrógeno hidroxílico asociado con el grupo carbonilo. Así, la resonancia de este protón en la sustancia sintética **26c** ocurre a 12.21 δ ¹⁷⁷, un valor bajo comparado con el del artemol que lo hace a 12.91 δ . Sin embargo, en el producto **26d**, aislado de *Dorinicum macrophyllum*,¹⁸⁸ resuena a 12.97 muy similar al de nuestro compuesto. Por otra parte, la espeleona¹⁷⁷ (**27**), que hemos ahora aislado de *A. absinthium*, debe ser el precursor biogénico del artemol (**26a**), y ambos deben tener el grupo metoxilo en la misma posición (C-2).

La estructura **26e** se le ha dado al glutinosol, que había sido obtenido de la *Artemisia glutinosa*.¹⁸⁹ Como la resonancia del protón hidroxílico ocurre a 12.85 δ , valor muy similar al del artemol, es probable que su estructura esté equivocada, siendo la correcta la **26f**, es decir el 3'-hidroxi derivado del artemol (**26a**).

A continuación (tablas 33, 34, 35 y 36) se presentan los resultados de las pruebas de actividad biológica realizadas con este grupo de compuestos fenólicos.

Tabla 33. Ensayos de actividad leishmanicida, tripanocida y citotoxicidad sobre células de mamífero (CHO) (ED₅₀, $\mu\text{g/ml}$).

Compuesto	CHO	<i>L. infantum</i>	<i>T. cruzi</i>
26	34.3 (23.9, 48.8)	≈ 100	>100
27	>100	28.7 (23.1, 35.6)	>100
28	39.9 (31.2, 51)	>100	>100
29	13.7 (10.9, 17.2)	≈ 100	≈ 100

ED₅₀: dosis capaz de producir un 50% de actividad.

De todos los compuestos ensayados, cabe destacar la actividad citotóxica de las dos flavonas (**28** y **29**), así como la del compuesto **26**, siendo mayor la actividad del

¹⁸⁸ Bohlmann, F., Grenz, M., (1979). Neue tremeton-derivate aus *Dorinicum macrophyllum*. Phytochemistry 18: 179-181.

compuesto **29**, con una ED_{50} de 13.7 $\mu\text{g/ml}$. La actividad citotóxica de estos productos nos permite ordenarlos de la siguiente forma: **29**>**26**>**28**>**27** (tabla 33).

Por el contrario la actividad leishmanicida solo se ha producido con el compuesto que ha presentado una menor citotoxicidad, el **27**, con un efecto elevado como refleja la ED_{50} de 28.7 $\mu\text{g/ml}$. Estos resultados nos indican que este producto presenta una selectividad sobre *Leishmania*, ya que no es activo ni con epimastigotes de *T. cruzi*, ni con células de mamífero (CHO) (tabla 33).

En el caso de *T. cruzi*, ningún producto de este grupo ha resultado ser activo.

Tabla 34. Efectos tóxicos sobre larvas *S. littoralis* (canulación oral, 40 $\mu\text{g/larva}$) y ensayos de citotoxicidad con células de *S. frugiperda* (los datos se expresan ED_{50} $\mu\text{g/ml}$).

Compuesto	Citotoxicidad	<i>S. littoralis</i>	
	Sf9 ^a	ΔB^b	ΔI^c
26	>100	80* pANCOVA2=0.1	84*
27	15 (8.6, 15.4)	103	103
28	≈ 100	111	86*
29	26.2 (21.7, 31.5)	107.8	99.7

*Indica diferencias significativas respecto al control ($p < 0.05$). ^aCélulas de ovario de *Spodoptera frugiperda*. ^bCrecimiento relativo expresado con % del control (ΔB =variación del peso del insecto en mg). ^cConsumo relativo expresado como % del control (ΔI = mg de alimento consumido).

En cuanto a la toxicidad con células de insecto (Sf9) (tabla 34), hay que destacar la elevada actividad del compuesto **27**, con una ED_{50} de 15 $\mu\text{g/ml}$, seguido del **29** con una ED_{50} de 26.2 $\mu\text{g/ml}$. Además, hay que tener en cuenta que el producto **27** no presenta actividad con células de mamífero, lo que indica una toxicidad selectiva entre insectos y mamíferos (tablas 33 y 34).

Por otro lado, el producto **26** no presenta actividad citotóxica ($ED_{50} > 100$ $\mu\text{g/ml}$) y sin embargo sí se ha observado actividad antialimentaria postingestiva significativa (ANCOVA 1 $p < 0.05$), aunque esta actividad no ha sido acompañada de efectos tóxicos postingestivos (ANCOVA2 $p > 0.05$). Se ha producido una disminución

¹⁸⁹ González, G.A., Bermejo, J., Estévez, F., Velázquez, R. (1983). Phenolic derivatives from *Artemisia glutinosa*. Phytochemistry. 22: 151-1516.

del peso de la larva ($\Delta B=80$) que ha sido consecuencia de una disminución de la ingesta ($\Delta I=84$) (tabla 34).

Tanto el compuesto **27** como el **29**, aunque tienen actividad citotóxica con células de insecto, no presentan toxicidad sobre larvas de *S. littoralis*, ni actividad antialimentaria postingestiva. Esto puede ser debido al sistema de detoxificación de la larva, que los inactiva o elimina antes de que produzcan toxicidad.

El compuesto **26** pierde los efectos tóxicos que presentaba con células de mamífero (CHO) en los ensayos de citotoxicidad con células de insecto (Sf9), ya que la ED_{50} es aproximadamente de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Sin embargo, en el ensayo con larvas de *S. littoralis*, se ha observado una disminución de la ingesta significativa (ANCOVA 1 $p<0.05$), aunque no fue lo suficiente para disminuir el peso de la larva.

Tabla 35. Actividad antialimentaria frente a diversos insectos diana (dosis 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$)

Compuesto	<i>R. padi</i>			<i>M. persicae</i>			<i>S. littoralis</i>
	%SI ^a	%T ^b	%C ^c	%SI ^a	%T ^b	%C ^c	%FR ^d /EC ₅₀
26	ne	ne	ne	21.1	47 \pm 14	53 \pm 14	32* \pm 19
27	30.3*	41 \pm 16	59 \pm 16	55*	30 \pm 21	70 \pm 21	74* \pm 29 11.1 (4.3, 28.4)
28	28.9	49 \pm 27	51 \pm 27	32.1	44 \pm 26	56 \pm 26	41 \pm 42
29	32.7	42 \pm 15	58 \pm 15	33.1	44 \pm 27	56 \pm 27	29 \pm 38

^aPorcentaje de inhibición del asentamiento; ^bPorcentaje de pulgones asentados en el tratamiento; ^cPorcentaje de pulgones asentados en el control; ^dPorcentaje de inhibición de la alimentación; *Indica diferencias significativas respecto al control ($p<0.05$). EC₅₀: dosis capaz de producir un 50% de actividad. ne: no se realizó el ensayo

El único compuesto con actividad antialimentaria con larvas de *Spodoptera* ha sido el compuesto **27**, con un porcentaje de inhibición alimentaria del 74% y una ED_{50} de 11.1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. También hay que destacar que este ha sido el único de los compuestos fenólicos que ha presentado actividad inhibidora del asentamiento de áfidos significativa. Esta actividad ha sido moderada con *M. persicae* (SI=55%) y leve o nula con *R. padi* (SI=30.3%) (tabla 35).

Por el contrario, tanto las flavonas como el compuesto **26** no han presentado ningún tipo de actividad antialimentaria con los insectos diana utilizados (*S. littoralis*, *M. persicae* y *R. padi*) (tabla 35).

Tabla 36. Efectos fitotóxicos de vigor con semillas de *L. sativa* (dosis 100 µg/cm²), expresados como % del control.

Compuesto	Longitud radicular
26	98
27	84*
28	91
29	86*

*Indica diferencias significativas respecto al control (p<0.05).

No se ha observado ningún efecto fitotóxico sobre la germinación de las semillas de *L. sativa* durante todo el ensayo con ninguno de los compuestos estudiados (resultados no presentados). Sin embargo, hay que destacar que los compuestos **27** y **29**, redujeron la longitud de las raíces, aunque de forma moderada-baja, con unos valores de 84 y 86% con respecto al control.

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios cruciales para muchas funciones vitales de las plantas. Intervienen en funciones estructurales, de defensa y en interacciones de las plantas con el medio que les rodea. Se conocen miles de compuestos polifenólicos en plantas superiores y su número sigue aumentando continuamente.¹⁹⁰ Estos compuestos se caracterizan por presentar en su estructura química un anillo aromático hidroxilado.

Los flavonoides son una subclase de compuestos fenólicos con una estructura de benzo-γ-pirona. Han sido descubiertos más de 4000 flavonoides de origen natural, y solo en la clase de las flavonas, un tipo específico de flavonoides, son posibles más de

¹⁹⁰ Boudet, A.-M. (2007). Evolution and current status of research in phenolic compounds. *Phytochemistry*. 68: 2722-2735.

36.000 estructuras químicas diferentes. Los flavonoides aparecen en una gran variedad de fuentes vegetales como frutas, verduras, frutos secos, semillas, cereales, te...¹⁹¹

La actividad biológica de estos compuestos se cree que es debida a las propiedades antioxidantes que presentan. Se han descrito flavonoides con actividad antiprotozoaria,¹⁹² antiviral,¹⁹³ antitumoral, antiisquémica, antialérgica y antiinflamatoria entre otras.¹⁹⁴

Los compuestos antioxidantes son aquellos capaces de retrasar o de inhibir la oxidación de lípidos o de otras moléculas, mediante la inhibición de reacciones de oxidación.¹⁹⁵ La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos es principalmente debida a sus propiedades redox, que pueden jugar un papel importante en la adsorción y neutralización de radicales libres o en la descomposición de peróxidos.¹⁹⁶

El compuesto **28** se ha descrito como agente antioxidante rápido, que neutraliza radicales peroxilo. Para esta actividad se ha visto que son importantes la presencia del doble enlace en C2-C3, la función oxo en C-4 (importante para la actividad citotóxica), y el grupo metoxilo en C-3'.¹⁹⁴ Este compuesto también presenta propiedades antibacterianas, antifúngicas,¹⁹⁷ antitumorales¹⁸⁶ y antiinflamatorias.¹⁹⁸ En cuanto al

¹⁹¹ Marín, F.R., Frutos, M.J., Pérez-Álvarez, J.A., Martínez-Sánchez, F., Del Río, J.A. (2002). Flavonoids as nutraceuticals: structural related antioxidant properties and their role on ascorbic acid preservation. En: Studies in Natural Products Chemistry. Vol. 26. Bioactive Natural Products (Part G). A. U.Rahman .Ed. Elsevier. Amsterdam. 183-292.

¹⁹² Mittra, B., Saha, A., Chowdhury, A.R., *et.al.* (2000). Luteolin, an abundant dietary component is a potent anti-leishmanial agent that acts by inducing topoisomerase II-mediated kinetoplast DNA cleavage leading to apoptosis. Mol Medicine. 6: 527-541.

¹⁹³ Nakane, H., Ono, K., (1990). Differential inhibitory effects of some catechin derivatives on the activities of human immunodeficiency virus reverse transcriptase and cellular desoxyribonucleic and ribonucleic acid polymerases. Biochemistry. 29: 2841-2845.

¹⁹⁴ Dugas, J.A., Castañeda-Acosta, J., Bonin, G.C., Price, K.L., Fischer, N.H., Winston, G.W. (2000). Evaluation of the total peroxyl radical-scavenging capacity of flavonoids: structure-activity relationships. J. Nat. Prod. 63: 327-331.

¹⁹⁵ Velioğlu, Y.S., Mazza, G., Gao, L., Oomah, B.D. (1998). Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. J. Agric. Food Chem. 46: 4113-4117.

¹⁹⁶ Osawa, T. (1994). Novel natural antioxidants for utilization in food and biological systems. (1994). En Postharvest Biochemistry of plant Food-Materials in the Tropics; Uritani, I., García, V.V., Mendoza, E.M. Eds. Japan Scientific Societies Press: Tokyo, Japan, 241-251.

¹⁹⁷ Sathiamoorthy, B., Gupta, P., Kumar, M., Chatuvedi, A.K., Shukla, P.K., Maurya, R. (2007). New antifungal flavonoid glycoside from *Vitex negundo*. Bioorg. Med.Chem. 17: 239-242.

¹⁹⁸ Sertié, J.A.A., Basile, A.C., Panizza, S., Matida, A.K., Zelnik, R. (1990). Anti-inflammatory activity and sub-acute toxicity of artemetin. Planta Med. 56: 36-40.

flavonoide **29** presenta propiedades antiinflamatorias¹⁹⁹ y citotoxicidad antitumoral, la cual tiene lugar mediante múltiples mecanismos de actividad.²⁰⁰

En los ensayos llevados a cabo con los compuestos fenólicos, los dos flavonoides (**28** y **29**) han resultado ser citotóxicos con células de mamífero, y parece que la sustitución de un grupo metoxilo por un hidroxilo (C-4') potencia la actividad. El compuesto **26** es citotóxico, al contrario que su derivado **27**, que al perder un grupo hidroxilo pierde la actividad. Parece que la actividad citotóxica está ligada a la presencia de grupos hidroxilo, probablemente en relación con la variación de las características antioxidantes de la molécula.

En ensayos con tripomastigotes de *Trypanosoma brucei rhodesiense*, la flavona **28** no es activa, aunque produce efectos sinérgicos aumentando la actividad tripanocida de otras flavonas.²⁰¹ Además potencia la actividad antiplasmódica de la artemisinina, lo cual se ha descrito también con el compuesto **29**. Hay que añadir que tanto el compuesto **28** como el **29**, han presentado actividad antimalárica *in vitro* con *Plasmodium falciparum*.²⁰²

Por otro lado, en ensayos con promastigotes de *Leishmania amazonensis* se ha observado que la actividad de los flavonoides aparece en compuestos con 2 grupos hidroxilos en las posiciones C-3' y C-4', mientras que se pierde cuando introducimos un grupo metoxilo en C-3'.²⁰³ Los resultados sugieren que puede existir una relación entre la actividad leishmanicida y el número y la posición de los grupos hidroxilos en los flavonoides.^{192,203} Esta puede ser la explicación de la ausencia de actividad de los dos flavonoides ensayados (**28** y **29**) con *L. infantum*, ya que ambos presentan un grupo metoxilo en C-3'.

¹⁹⁹ Lin, S., Zhan, Han, T., Wu, J.-Z., Rahman, K., Qin, L.-P. (2007). In vivo effect of casticin on acute inflammation. J. Chinese Int. Med. 5: 573-576.

²⁰⁰ Haidära, K., zamir, L., Shi, Q.-W., Batist, G. (2006). The flavonoid casticin has multiple mechanisms of tumor cytotoxicity action. Cancer Lett. 242: 180-190.

²⁰¹ Hoet, S., Oppendoes, F., Brun, R., Quentin-Leclercq, J. (2004). Natural products active against African trypanosomes: a step towards new drugs. Nat.Prod.Rep. 21: 353-364.

²⁰² Liu, K. C-S., Yang, S.L., Roberts, M.F., Elford, B.C., Phillipson, J.D. (1992). Antimalarial activity of *Artemisia annua* flavonoids from whole plants and cell cultures. Plant Cell Rep. 11: 637-640.

²⁰³ Taleb-Contini, S.H., Salvador, M.J., Balanco, J.M.F., Alburquerque, S., de Oliveira, D. C.R. (2004). Antiprotozoal effect of crude extracts and flavonoids isolated from *Chromolaena hirsuta* (Asteraceae). Phytother. Res. 18: 250-254.

De todos los productos de este grupo ensayados con *T. cruzi*, ninguno ha presentado actividad; sin embargo en el caso de *L. infantum*, el compuesto **27** ha presentado una actividad elevada. En este caso, el único compuesto que no tiene grupos hidroxilos en la molécula ha sido el único activo.

Aunque no se ha observado actividad antiparasitaria con las flavonas, pueden estar produciendo efectos de sinergismo en presencia de otros compuestos activos de la planta, teniendo en cuenta que son compuestos mayoritarios (23%; ver sección 2.1.3). Esto explicaría la elevada actividad antiparasitaria que presenta la planta en comparación con la de los metabolitos aislados.

La actividad citotóxica con células de insecto (Sf9) se da en el caso de los productos **27** y **28**, aunque los datos no son suficientes para establecer relaciones estructura actividad. El compuesto **27** presenta además actividad antialimentaria por repelencia con larvas de *S. littoralis*, aunque no se ha observado toxicidad ni actividad antialimentaria postingestiva en los ensayos de canulación. Este compuesto se ha descrito como antifúngico¹⁸⁰ e insecticida con hormigas de la especie *Crematoaster scutellaris* y termitas de la especie *Reticulitermes balkanensis*.²⁰⁴ Por otro lado, cabe destacar la actividad antialimentaria postingestiva del compuesto **26**.

Finalmente, en los estudios de fitotoxicidad los efectos de estos productos son moderados, apareciendo una ligera inhibición de la longitud radicular con los compuestos **27** y **29**.

En estudios anteriores con semillas de *L. sativa* se ha observado que la metilación del grupo carboxilo de los ácidos fenólicos reduce la actividad inhibidora del crecimiento radicular. Además, en los flavonoides la metilación de los grupos hidroxilos potencia el crecimiento de las raíces.²⁰⁵ Esto explica por qué el compuesto **29** ha sido algo más activo que el **28**. De todas formas, en relación a los compuestos **26** y **27**, hay

²⁰⁴ Christodouloupoulou, L., Tsoukatou, M., Tziveleka, L.A., Vagias, C., Petrakis, P.V., Roussis, V. (2005). Piperidinyl amides with insecticidal activity from the maritime plant *Otanthus maritimus*. J. Agric. Food Chem. 53: 1435-1439.

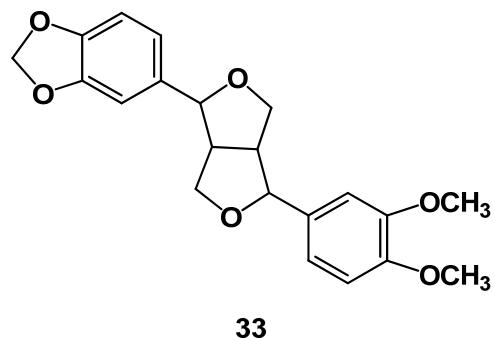
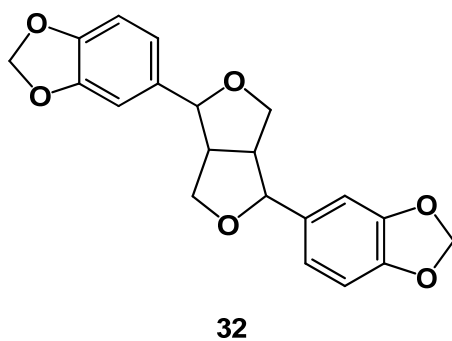
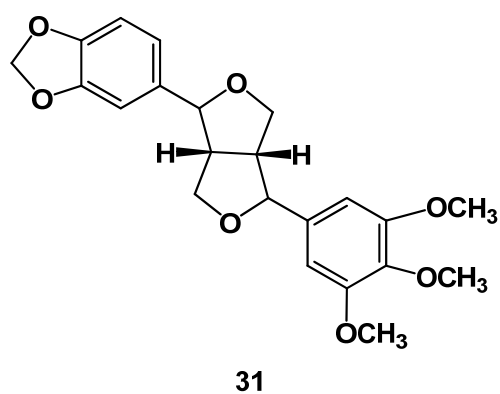
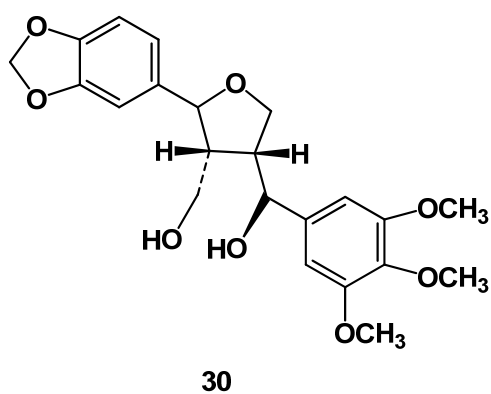
²⁰⁵ Yoshioka, T., Inokuchi, T., Fujoka, S., Kimura, Y. (2004). Phenolic compounds and flavonoids as plant growth regulators from fruit and leaf of *Vitex rotundifolia*. Z. Naturforsch. 59: 509-514.

que destacar que la presencia de un hidroxilo en la molécula disminuye la actividad inhibidora de la longitud radicular.

En conclusión, los compuestos **26** y **27** presentan actividad antiparasitaria e insecticida y los flavonoides **28** y **29** citotóxica.

2.2.2.3. Lignanós

Este grupo está formado por 4 productos conocidos del grupo de los furofuran lignanos: sieversol (**30**), asantina (**31**), sesamina (**32**), kobusina (**33**). Estos compuestos se han aislado de la fracción 10-11 de la primera VLC que se llevó a cabo con el extracto crudo de ajeno.



El sieversol (**30**) se ha aislado anteriormente de la parte aérea de *Artemisia sieversiana*²⁰⁶ y la asantina (**31**) de la parte aérea de *A. absinthium*,²⁰⁷ flores de *Magnolia biondii*²⁰⁸ y parte aérea de *Artemisia arborescens*,²⁰⁹ entre otras. La sesamina (**32**) es un lignano ampliamente distribuido en las plantas, identificado por primera vez de *Piper longong*²¹⁰ y aislado también en semillas *Sesamum indicum*,²¹¹ en *Artemisia arborescens*²¹² y *Artemisia absinthium*,²⁰⁷ además de otras muchas especies. Por último, la kobusina (**33**) aparece en hojas de *Magnolia stellata*²¹³ y *Magnolia coco*.²¹⁴

En las tablas 37 y 38 se presentan los resultados obtenidos en los ensayos de actividad biológica. Los lignanos ensayados no presentan efectos antiparasitarios con *L. infantum* y *T. cruzi* ni citotóxicos con células de mamífero (CHO), siendo todos los valores de ED₅₀ superiores a 100 µg/ml (resultados no presentados).

Tabla 37. Efectos tóxicos sobre *S. littoralis* (canulación oral, 40 µg/larva) y ensayos de citotoxicidad con células de *S. frugiperda* (ED₅₀ µg/ml).

Compuesto	Citotoxicidad <i>S.littoralis</i>		
	Sf9 ^a	ΔB ^b	ΔI ^c
30	25.2 (15.2, 41.6)	92	82
31	3.2 (1.4, 7.6)	110	92
32	>100	97	96
33	20.7 (12.2, 35)	94	93

^aIndica diferencias significativas respecto al control (p<0.05). ^bCélulas de ovario de *S. frugiperda*. ^cCrecimiento relativo expresado con % del control (ΔB=variación del peso del insecto en mg). ^cConsumo relativo expresado como % del control (ΔI= mg de alimento consumido).

²⁰⁶ Tan, R.X., Tang, H.Q., Hu, J., Shuai, B. (1998). Lignans and sesquiterpene lactones from *Artemisia sieversiana* and *Inula racemosa*. *Phytochemistry*. 49: 157-161.

²⁰⁷ Greger, H., Hofer, O. (1980). New unsymmetrically substituted tetrahydrofurofuran lignans from *Artemisia absinthium*. *Tetrahedron*. 36: 3551-3558.

²⁰⁸ Pan, J.X., Hensens, O.D., Zink, D.L., Chang, M.N., Hwang, S.B. (1987). Lignans with platelet activating factor antagonist activity from *Magnolia biondii*. *Phytochemistry*. 26: 1377-1380.

²⁰⁹ Marco, J. A., Sanz-Cervera, J.F., García-Liso, V., Valles-Xirau, J. (1997). Sesquiterpene lactones and lignans from *Artemisia arborescens*. *Phytochemistry*. 44: 1133-1138.

²¹⁰ Peinemann, (1896). *Arch. Pharm. (Weinheim Ger.)*. 234: 258.

²¹¹ Marchand, P.A., Kato, M.J., Lewis, N. (1997). (+)-Episesaminone, a *Sesamum indicum* furofuran lignan. Isolation and hemisynthesis. *J. Nat. Prod.* 60 : 1189-1192.

²¹² Greger, H. (1979). Polyacetylene and Sesamines as chemical characters in the *Artemisia absinthium* group. *Planta Med.* 35: 84-91.

²¹³ Iida, T., Noro, Y., Ito K. (1983). Magnostellin A and B, novel lignans from *Magnolia stellata*. *Phytochemistry*. 22: 211-214.

²¹⁴ Yu, H.J., Chen, C.C., Shieh, B.J. (1998). The Constituents from the Leaves of *Magnolia coco*. *J. Chin. Chem. Soc.* 45: 773-778.

Aunque este grupo de lignanos no ha presentado citotoxicidad con células de mamífero (CHO), sí son tóxicos con células de insecto (Sf9), siendo el compuesto más activo el **31** ($ED_{50}=3.2 \mu\text{g/ml}$), seguido del **33** ($ED_{50}=20.7 \mu\text{g/ml}$) y por último el **30** ($ED_{50}=25.2 \mu\text{g/ml}$) (tabla 37). Cabe destacar la ausencia de citotoxicidad del compuesto **32**, ya que, aunque su estructura química es bastante similar a la de los otros tres lignanos, tiene dos grupos metilendioxi. Sin embargo, ninguno de estos compuestos muestra toxicidad postingestiva, lo que puede indicar que están siendo metabolizados antes de ejercer la toxicidad o no pueden llegar al lugar de acción debido a sus características fisicoquímicas.

En cuanto a la actividad antialimentaria (tabla 38), no han aparecido efectos significativos en ninguno de los ensayos realizados tanto con áfidos (*R. padi* y *M. persicae*) como con larvas de *S. littoralis*, ya que los índices de inhibición del asentamiento, y de inhibición alimentaria han sido inferiores a 50 y sin significación estadística ($p>0.05$).

Tabla 38. Actividad antialimentaria frente a diversos insectos diana (dosis $50 \mu\text{g/cm}^2$)

Compuesto	<i>R. padi</i>			<i>M. persicae</i>			<i>S. littoralis</i>
	%SI ^a	%T ^b	%C ^c	%SI ^a	%T ^b	%C ^c	%FR ^d
30	7.4	62 ± 21	38 ± 21	21.7	44 ± 17	56 ± 17	46 ± 50
31	ne	ne	ne	38.1*	39 ± 20	61 ± 20	8 ± 18
32	ne	ne	ne	22.2	51 ± 21	49 ± 21	26 ± 43

^aPorcentaje de inhibición del asentamiento; ^bPorcentaje de pulgones asentados en el tratamiento;

^cPorcentaje de pulgones asentados en el control; ^dPorcentaje de inhibición de la alimentación; *Indica diferencias significativas respecto al control ($p<0.05$). **EC₅₀**: dosis capaz de producir un 50% de actividad.

ne: no se realizó el ensayo.

Por último, en relación a las pruebas de actividad fitotóxica, ninguno de los lignanos ha presentado efectos significativos tanto en los ensayos de germinación como en los ensayos de vigor (variación de la longitud radicular) con semillas de *L. sativa* (resultados no presentados).

Los lignanos son un grupo de derivados diméricos de fenilpropanoides de diversas clases estructurales, que están ampliamente distribuidos en la naturaleza y tienen un considerable interés farmacológico. Muchos presentan actividad antimicrobiana, antiviral o antialimentaria, jugando un papel importante en la defensa de

las plantas frente a patógenos y herbívoros.²¹⁵ Además actúan como fitoestrógenos, tienen propiedades anticancerosas (principalmente las podofilotoxinas), modifican la función cardiovascular, son antioxidantes y modifican algunas enzimas implicadas en procesos inmunológicos e inflamatorios.²¹⁶

Hay que destacar la importancia de estos compuestos en relación a los efectos sinérgicos que producen sobre las propiedades antialimentarias e insecticidas de otros compuestos, como es el caso de la sesamina (**32**) y la asantina (**31**), que presentan propiedades sinérgicas con insecticidas de tipo piretroide.²¹⁷

Según estudios realizados con *Leishmania donovani*²¹⁸ y *Trypanosoma cruzi*²¹⁹ (cepas Bolivia e Y), se ha observado que el compuesto **32** no presenta actividad antiparasitaria frente a estas dos especies, aunque otros lignanos como la cubenina, aislada de *Piper cubeba* y de estructura similar al compuesto **32**, ha sido activa con ambas. Así mismo, los furofuran lignanos medioresinol y liriioresinol B, aislados de *Doliocarpus dentatus*,²²⁰ son activos frente a amastigotes de *L. amazonensis*. Sin embargo, en nuestro caso, ni el compuesto **32**, ni ninguno de los demás lignanos aislados (**30**, **31** y **33**) han presentado actividad antiprotozoaria frente a *L. infantum* o *T. cruzi*.

Aunque compuestos similares a los de este grupo producen efectos citotóxicos con líneas tumorales,²²¹ en los resultados obtenidos en este estudio en relación a la actividad citotóxica, se observa una ausencia de actividad sobre células de mamífero en todos los casos. Por el contrario, sí se han producido efectos citotóxicos con células de

²¹⁵ Gang, D.R., Dinkova-Kostova, A.T., Davin, L.B., Lewis, N.G. (1997). Phylogenetic Links in Plant Defense Systems: Lignans, Isoflavonoids, and Their Reductases. ACS Symp. Ser. 658: 58-89.

²¹⁶ Ríos, J.L., Giner, R.M., Prieto, J.M. (2002). New findings on the bioactivity of lignans. En: Studies in Natural Products Chemistry. Vol. 26. Bioactive Natural Products (Part G). A. U.Rahman .Ed. Elsevier. Amsterdam. 183-292.

²¹⁷ Lewis, N.G., Kato, M.J., Lopes, N., Davin, L.B. (1995). ACS Symp. Ser. 588: 135-167.

²¹⁸ Bodiwala, H.S., Singh, G., Singh, R., Dey, C.S., Sharma, S.S. *et al.* (2007). Antileishmanial amides and lignans from *Piper cubeba* and *Piper retrofractum*. J.Nat.Med. 61: 418-421.

²¹⁹ Bastos, J.K., Albuquerque, S., Silva, M.L.A. (1999). Evaluation of the trypanocidal activity of lignans isolated from the leaves of *Zanthoxylum naranjillo*. Planta Med. 65: 541-544.

²²⁰ Sausavi, M., Kunsech, N., Poisson, J., Gantier, J.C., Gayral, P., Dedet, J.P., (1996). Isolation of leishmanicidal triterpenes and lignans from the amazonian liana *Doliocarpus dentatus* (Dilleniaceae). Phytother. Res. 10: 1-4.

²²¹ Vuckovic, I., Trajkovic, V., Macura, S., Tesevic, Janackovic, P., Milosavljevic, S. (2007). A novel cytotoxic lignan from *Seseli annuum* L. Phytother. Res. 21: 790-792.

insecto de Sf9 (**31**>**33**>**30**), observándose que la actividad es máxima con la presencia del grupo trimetoxifenilo asociada a la presencia de dos anillos tetrahidrofuránicos en la estructura. Esta actividad disminuye con la pérdida de uno de los metoxilos del anillo aromático, y en mayor manera con la apertura de un anillo furánico, incluso en presencia del grupo trimetoxifenilo. Cuando en lugar del trimetoxifenilo aparece un metilendioxi fenilo, bloqueando dos de los metoxilos, no se observan efectos tóxicos (compuesto **32**), lo que indica que la presencia de al menos dos metoxilos sobre el anillo aromático es esencial para la actividad citotóxica de estos compuestos.

Entre los lignanos que presentan algún tipo de actividad con insectos se encuentran los análogos de las podofilotoxinas (eficaces inhibidores del crecimiento de insectos), sesamina y sesamolina (con actividad moderada como hormona juvenil en *Oncopeltus fasciatus*), p-benzolactona (inhibidor alimentario de insectos), sesamina y kobusina (inhibidores del crecimiento de las larvas de *Bombix mori*), al igual que otros neolignanos.²²² Licarin A, aislado de *Machilus japonica* disminuyó el crecimiento de *S. litura* sugiriendo un efecto sinérgico con otros metabolitos presentes en esta planta.²²³

En el mecanismo de defensa de algunas especies de la familia de las Asteráceas y de las Piperáceas aparecen lignanos inhibidores de las enzimas polisustrato monooxigenasas (PSMO), responsables de la biotransformación de metabolitos secundarios de las plantas en insectos polívoros. Esta inhibición es debida al grupo metilendioxfenil que presentan algunos de estos compuestos, como es el caso de los cuatro lignanos aislados en *A. absinthium* (de la familia de las Asteráceas), **30**, **31**, **32** y **33**.

En nuestro caso, ninguno de los lignanos ha presentado efectos sobre los insectos diana utilizados, aunque debido a la presencia en todos ellos del grupo metilendioxfenil, y dado que la actividad insecticida del extracto supera la obtenida por los compuestos aislados, pensamos que se están produciendo efectos de sinergismo entre estos productos y otros compuestos insecticidas presentes en el extracto.

²²² McRae, W.D., Towers, G.H.N. (1984). Biological activities of lignans. *Phytochemistry*. 23: 1207-1220.

²²³ González-Coloma, A., Escoubas, P., Mizutani, J., Lajide, L. (1994). Insect growth inhibitors from *Machilus japonica*. *Phytochemistry*. 35: 607-610.

Existen evidencias que sugieren que algunos lignanos pueden tener un papel en la regulación de los procesos fisiológicos de las plantas. Cabe destacar la actividad inhibidora de la germinación de monoepoxidolignanos aislados de *Aegilops ovata* y de raíz de patata.²²² Por el contrario ninguno de los lignanos aislados del ajeno ha presentado actividad fitotóxica.

En conclusión, podemos resumir que los fufofuran lignanos de este grupo son citotóxicos con células de insecto y posiblemente sean sinérgicos con otros insecticidas presentes en el ajeno.

2.2.2.4. Sinergismo

La sinergia se refiere a la acción de dos o más causas cuyo efecto es superior a la suma de los efectos individuales; es decir, es la integración de elementos que da como resultado algo más grande que la simple suma de éstos. Cuando dos o más elementos se unen sinérgicamente crean un resultado que aprovecha y maximiza las cualidades de cada uno de los elementos.

El término fitosinergista se usa para describir los compuestos presentes en las plantas que no tienen toxicidad por sí mismos pero que producen un aumento en la actividad de otros tóxicos coexistentes.²²⁴ Estos compuestos con actividad sinérgica parecen actuar inhibiendo las enzimas responsables de la detoxificación de compuestos aleloquímicos en los herbívoros.²²⁵ Hay compuestos que además de su potencial fitosinergista pueden presentar actividad insecticida por si mismos.²²⁶

Muchos compuestos que contienen el sustituyente metilendioxfenilo (MDP) son inhibidores de las PSMO, que son enzimas responsables del metabolismo de numerosos xenobióticos,²²⁷ como la xantotoxina. Entre ellos podemos encontrar

²²⁴ Krieger, R.I., Feeny, P.P. and Wilkinson, C.F. (1971). Detoxication enzymes in the guts of caterpillars: An evolutionary answer to plant defenses? Science 172: 579-581.

²²⁵ Berenbaum, M. Brementown revisited: Allelochemical interactions in plants. (1985). Recent. Adv. Phytochem. 19: 139-169.

²²⁶ Lichtenstein, E.P., and Casida J. E. (1963). Myristicin, an insecticide and synergist occurring naturally in the edible parts of parsnip. J. Agric. Food Chem. 11:450-415.

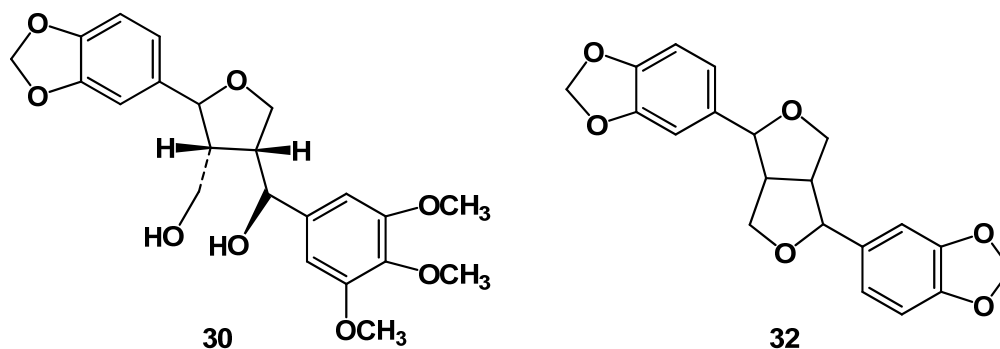
²²⁷ Hodgson, E. Microsomal mono-oxygenases. (1985) pp 225-321, in G.A. Kerkut and L.I. Gilbert (eds.) Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology. Pergamon Press, New York.

fitosinergismo con la xantotoxina.²²⁸desarrollo de resistencias.²²⁹

sinergistas,^{217,228} nos llevó a plantear estudios preliminares sobre sinergismo con compuestos aislados de *A. absinthium*.

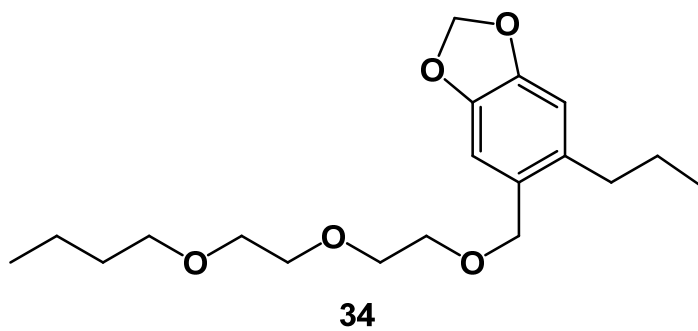
la sesamina (**32**; procedente del ajeno) y el butóxido de piperonilo (**34**; comercial).

Sinergistas:



²²⁸ Neal, J.J. (1989). Myristicin, Safrole, and Fagaramide as Phytosinergists of xanthotoxin. *J. Chem. Ecol.*, 15: 309-315.

²²⁹ Raffa, K.F., Priester, T.M. (1985). Synergistics as research tools and control agents in agriculture. J.Agric. Entomol. 2: 27-45.



Compuestos utilizados en el ensayo:

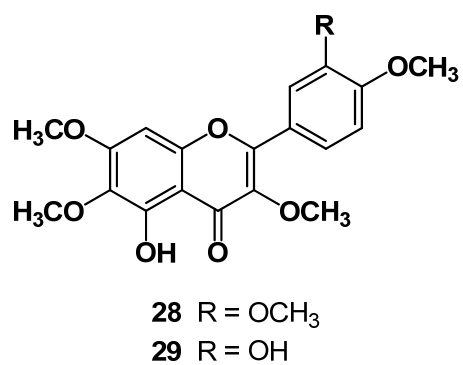
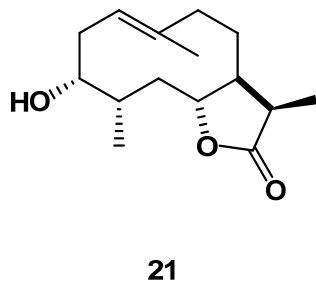
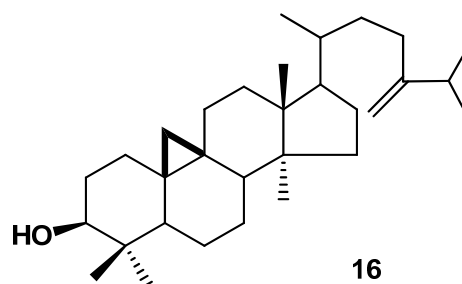
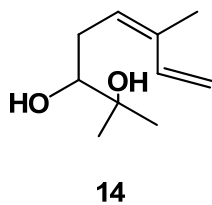


Tabla 39. Estudio de sinergismo: ensayos de citotoxicidad sobre células Sf9 expresado en % de mortalidad

(50+50) µg/ml	Mortalidad obtenida (%)	Mortalidad esperada (%)	Actividad
30+16	0	53	E>O
30+28	71	90	E> O
30+29	100	100	E= O
30+21	87	100	E> O
30+14	65	53	E< O
32+16	53	49	E= O
32+28	67	86	E> O
32+29	98	100	E= O
32+21	57	100	E> O
32+14	59	49	E< O

E: actividad esperada (suma de las actividades de los compuestos por separado a 50 µg/ml); O: actividad obtenida en el ensayo

Comparando la mortalidad teórica con la real en células de insecto (Sf9), solo se observan posibles efectos sinérgicos en el caso del producto **14** (monoterpeno derivado del epóxido de ocimeno), tanto cuando se administra junto a lignano **30** como cuando se administra con el **32**. Aún así estos efectos son de tipo moderado ya la mortalidad real solo aparece entre un 10-12% más de lo esperado (tabla 39).

Tabla 40. Estudio de sinergismo: efectos tóxicos sobre *S. littoralis* (canulación oral, 40 µg / larva).

Tratamiento	<i>S.littoralis</i>	
	ΔB^a	ΔI^b
32 + 29	117* pANCOVA ₂ =0.16	116*
34+ 29	95	96
29	107.8	99.7
32	97	96

*Indica diferencias significativas respecto al control ($p<0.05$). ^aCrecimiento relativo expresado con % del control (ΔB =variación del peso del insecto en mg). ^bConsumo relativo expresado como % del control (ΔI = mg de alimento consumido).

En cuanto a las pruebas de toxicidad con larvas de *S. littoralis*, se han observado efectos significativos moderados sobre aumento del peso(ΔB) y de la ingesta(ΔI) en el caso de los productos **29** y **32** (ANOVA 1, $p < 0.05$), que no estuvo acompañado de toxicidad (ANCOVA 2, $p > 0.05$) (tabla 40). Sin embargo, como los resultados observados son poco relevantes y considerando que han sido nulos los obtenidos con el conocido sinergista butóxido de piperonilo (**34**), podemos concluir que el producto **29** no tiene toxicidad postingestiva.

Los resultados de citotoxicidad sugieren sinergismo entre los componentes del aceite esencial y la sesamina (**32**), ya que el compuesto **14** es uno de los componentes mayoritarios del aceite. En cualquier caso es necesario realizar más estudios para confirmar esta hipótesis.

Conclusiones

Conclusiones

Persea indica

1. Los extractos de raíces, tallos y hojas de *P. indica* presentan actividad antialimentaria frente a *S. littoralis*, siendo más activo el extracto de tallos.
2. Del estudio fitoquímico del extracto de raíces aeropónicas de *P. indica* se han obtenido las alquil lactonas acetato de majorenolida (**1**), majorenolida (**2**), acetato de majorinolida (**3**), majorinolida (**4**), los persananos *p*-hidroxi-*cis*-cinamato de persanol (**5**) y *p*-hidroxi-*trans*-cinamato de persanol (**6**) y el ryanodano anhidrocinnzeylanina (**7**), aislado anteriormente de la parte aérea de esta planta. Los compuestos **1** y **3** no se han aislado anteriormente en la naturaleza, aunque si se han obtenido por vía sintética mediante la acetilación de los compuestos **2** y **4**. Los compuestos **5** y **6** son nuevos en la naturaleza.
3. Las alquil lactonas **2** y **3** son activas con *L. infantum* y *T. cruzi* mientras que la **4** solo es activa frente al primero. Los compuestos **1**, **2** y **4** son citotóxicos, **2** es fagorepelente y **4** activo con *S. littoralis*. Además **2** y **4** inhibieron la germinación de las semillas de *L. sativa*.
4. La actividad antiparasitaria de las alquil lactonas aumenta cuando disminuye el grado de instauración de la cadena lateral mientras que la presencia de un grupo acetato en la posición 6 anula la actividad cuando la cadena lateral termina en un grupo etileno. Además, un anillo en posición 6 y el grupo acetileno de la cadena lateral potencian la actividad citotóxica frente a Sf9. La actividad fagorepelente se incrementa con la presencia de un OH en posición 6 y un etileno en la cadena lateral de la lactona.
5. El perseaneno **6** es antiparasitario, el **5** y el **6** son citotóxicos y fitotóxicos, afectando a la germinación de *L. sativa*. Además **5** es tóxico, y **6** antialimentario con *S. littoralis*.

6. Todos los ryanodanos excepto el compuesto **12** presentan actividad antialimentaria con *S. littoralis*. Los compuestos **8**, **9** y **12** presentan actividad antialimentaria postingestiva, y el **9** produce toxicidad.
7. Las posiciones C-14 y C-1 de los ryanodanos juegan un papel importante en la actividad insecticida. La esteroquímica β del C1 (**13** frente a **9**) y su O-acetilación (**10**) aumentan la toxicidad y la actividad insecticida de estos compuestos. La hidroxilación de C-14 y la hidrofobia del anillo ciclohexánico determinan actividades antialimentarias intermedias. En los isoryanodanos como el **11**, la hidroxilación de C-1 y la polaridad del anillo A (sustituyentes en C-8 y C-13) juegan un papel importante en la actividad insecticida.
8. Los ryanodanos **8** y **9** se distribuyen de forma diferente en raíces, hojas y tallos. El compuesto **8** aparece en mayor cantidad en tallos, después en raíces y muy poco en hojas, mientras que el compuesto **9**, aparece mayoritariamente en tallos, después en hojas **8** y es prácticamente inexistente en raíces.
9. En las hojas, los metabolitos mayoritarios son tres compuestos no identificados de pesos moleculares 421, 431 y 399 (isómero del compuesto **8**). Además aparecen los compuestos **8**, **9**, **10**, **11**, **12**, **13**, cinnzeylanona (**C**) y ryanodol-14-monoacetato (**RM**).
10. En tallos, los compuestos mayoritarios son **9**, un isómero de **8**, cinnzeylanona (**C**) y un isómero de **5** u **6**. Además aparecen 2,3 dehidrocinnzeylanona (**DHC**), **8**, **5** y **6**, **10**, **11**, **13**.
11. En las raíces, los compuestos mayoritarios son **5**, **6** y **7**. También aparecen cinnzeylanona (**C**), un isómero de la cinnzeylanona (**IC**), el compuesto **8**, dos isómeros del **8** y un isómero del compuesto **7**.
12. Por tanto, proponemos la especie *P. indica* como una fuente renovable de insecticidas (tallos>hojas>raíces).

*Artemisia absinthium***Estudio de poblaciones**

1. Los componentes mayoritarios de los aceites de Sierra Nevada (**SN**) son acetato de bornilo (15.1%), crisantenol (12.3%) y epibiciclosesquifelandreno (9.1%) en la población (**SNC03Ae**), y 2,6-dimetil-5,7-octadien-2,3-diol (54.1%) y crisantenol (21.4%) para la población (**SNI05Ae**). Las condiciones no controladas del invernadero (población **SNI05Ae**), se relacionan con un aceite más rico en monoterpenos oxigenados y con una menor cantidad de sesquiterpenos. Los aceites de esta población presentan unos perfiles químicos que no se ajustan a los quimiotipos descritos en la península ibérica
2. Los componentes mayoritarios del aceite de la población de Villacampa (**V**) son cis-epoxiocimeno (50.2%), acetato de crisantenilo (35.4%) y crisantenol (10.2%), correspondiendo al quimiotipo B.
3. En relación a la población de Aragón, CITA (**C**), el quimiotipo es el B, ya que los componentes mayoritarios son cis-epoxiocimeno y acetato de crisantenilo. Las dos muestras estudiadas (Ejea y Teruel), presentan una composición química similar, observándose únicamente variaciones en metabolitos minoritarios. En las dos poblaciones los compuestos mayoritarios del aceite esencial son monoterpenos oxigenados.
4. El aceite (**H1**) y las fracciones (**H2** y **H3**) estudiados pertenecen al quimiotipo G, que presenta como componente mayoritario la tuyona y derivados de su ruta metabólica, como el acetato de sabinilo. La fracción **H2** es la que presenta una mayor concentración de tuyonas y menor de acetato de sabinilo; la fracción **H3**, presenta una elevada proporción de acetato de sabinilo y baja de tuyonas. El aceite **H1** presenta un perfil intermedio entre las dos fracciones anteriores (**H2** y **H3**).

5. Los extractos de parte aérea y raíces de la población **SNC07** presentan las flavonas **33** y **34**, que son los compuestos mayoritarios de la parte aérea, pero no de las raíces.
6. Las muestras **CT02Ae**, **CE03Ae**, **CE03ExA**, **CEFS1**, **SNC03Ae**, **SNC07ExA**, **SNC07ExR** y **H2** son antiparasitarias con *L. infantum* y *T. cruzi*, excepto **H2** que solo fue activa con *L. infantum* siendo **SNC03ExA** y **CEFS1** las más activas. Además, todas presentaron citotoxicidad frente a CHO.
7. La actividad antialimentaria siguió un patrón común frente a las tres especies de insectos, siendo las muestras más activas **CE03Ae/Ex**, **CT02ExA**, **CT03Ae**, **CT05ExA**, **CFS1-2**, **SNC03ExR**, **SN03ExR**, **H2-3** y **tuyona**. Los más activos frente a *S. littoralis* fueron **H1**, **CEFS1**, **CTFS2**, **H2**, **CE03Ae**, **CE03ExA**, frente a *M. persicae* **FS1**, **CT06Ae** y **SNC03ExA** y frente a *R. padi*, **FS1**, **FS2** y **CT02ExA**. La actividad frente *M. persicae* se explica por la presencia del γ -selineno en un 46.7% (R^2 ajustado). Además, los extractos obtenidos por **fluidos supercríticos** han resultado ser más activos que los extractos y aceites de las muestras de **Ejea** y **Teruel** del año 2003 de las que proceden y la tuyona es mas activa que los aceites y fracciones comerciales (**H**).
8. Los aceites **H2** y **CE03Ae** son repelentes frente a *R. prolixus*.
9. La actividad fungicida más elevada fue obtenida con las muestras **T02ExA**, **H2** y **H3**. La población de **Teruel** ha resultado ser la más eficaz de todas frente a las tres especies de hongos. La presencia del p-cimeno explica un 28.6% (R^2 ajustado) de la actividad frente a *F. solani* y el p-cimeno y el 2,6-dimetil-5,7-octadien-2,3-diol explican un 58.58% (R^2 ajustado) de la actividad frente a *F. oxysporum*.
10. El aceite **CE06Ae** inhibe la germinación de semillas de *Triticum aestivum* a las 24 horas y la longitud radicular de *Hordeum vulgare*.
11. La actividad antialimentaria frente a áfidos y *S. littoralis* de las fracciones del extracto **CE03ExA**, fue menor en todos los ensayos que los obtenidos con el extracto crudo.

Estudio fitoquímico de la población CE03

12. Del estudio fitoquímico del extracto de parte aérea **CE03ExA** se ha obtenido el monoterpeno (Z)-2,6-dimetilocta-5,7-dien-2,3-diol (**14**); el diterpeno ácido dehidrabiético (**15**); los esteroides 24-metilencicloartanol (**16**), acetato de 24-metilencicloartanol (**17**), lagerenol (**18**), acetato de lagerenol (**19**) y cicloart-23-Z-ene-3 β -25 diol (**20**); los sesquiterpenos hidroxipelenólido (**21**), cetopelenólido A y B (**22** y **23**), dihidrocostunolida (**26**), absilactona (**25**); los compuestos fenólicos artemol (**26**), espeletona (**27**), artemetina (**28**) y casticina (**29**) y los lignanos sieversol (**30**), aschantina (**31**), sesamina (**32**) y kobusina (**33**). El sesquiterpeno **25** y el compuesto fenólico **26** son estructuras nuevas en la naturaleza.
13. El monoterpeno **14** presenta una actividad antialimentaria moderada con *S. littoralis*.
14. El esteroide **28** es antiparasitario y citotóxico con CHO, el compuesto **16** es citotóxico con células de insecto (Sf9) y su acetato (**17**) presenta actividad antialimentaria postingestiva con larvas de *S. littoralis*. La presencia de un OH en C-3 y la existencia de un carbonilo o un metileno en C-24 son determinantes para la actividad de este tipo de compuestos. La citotoxicidad con células de mamífero viene dada por la presencia de un grupo OH en C-3 y un carbonilo en C-24, mientras que en el caso de las células de insecto, la actividad se da únicamente con la presencia de un OH en C-3 y un metileno en C-24. La actividad postingestiva tiene lugar con la presencia de un grupo acetato en C-3 y un metileno en C-24.
15. Dentro del grupo de los sesquiterpenos, los compuestos **21**, **22** y **25** fueron citotóxicos con Sf9, siendo **25** el más activo. **22** es fagorepelente con *R. padi* y **21** con *M. persicae*. Además **21** y **24** inhiben la longitud radicular de semillas de *L. sativa* siendo **24** el más activo. La presencia de una γ -lactona α,β -insaturada potencia la actividad citotóxica y su ausencia potencia la actividad alelopática.

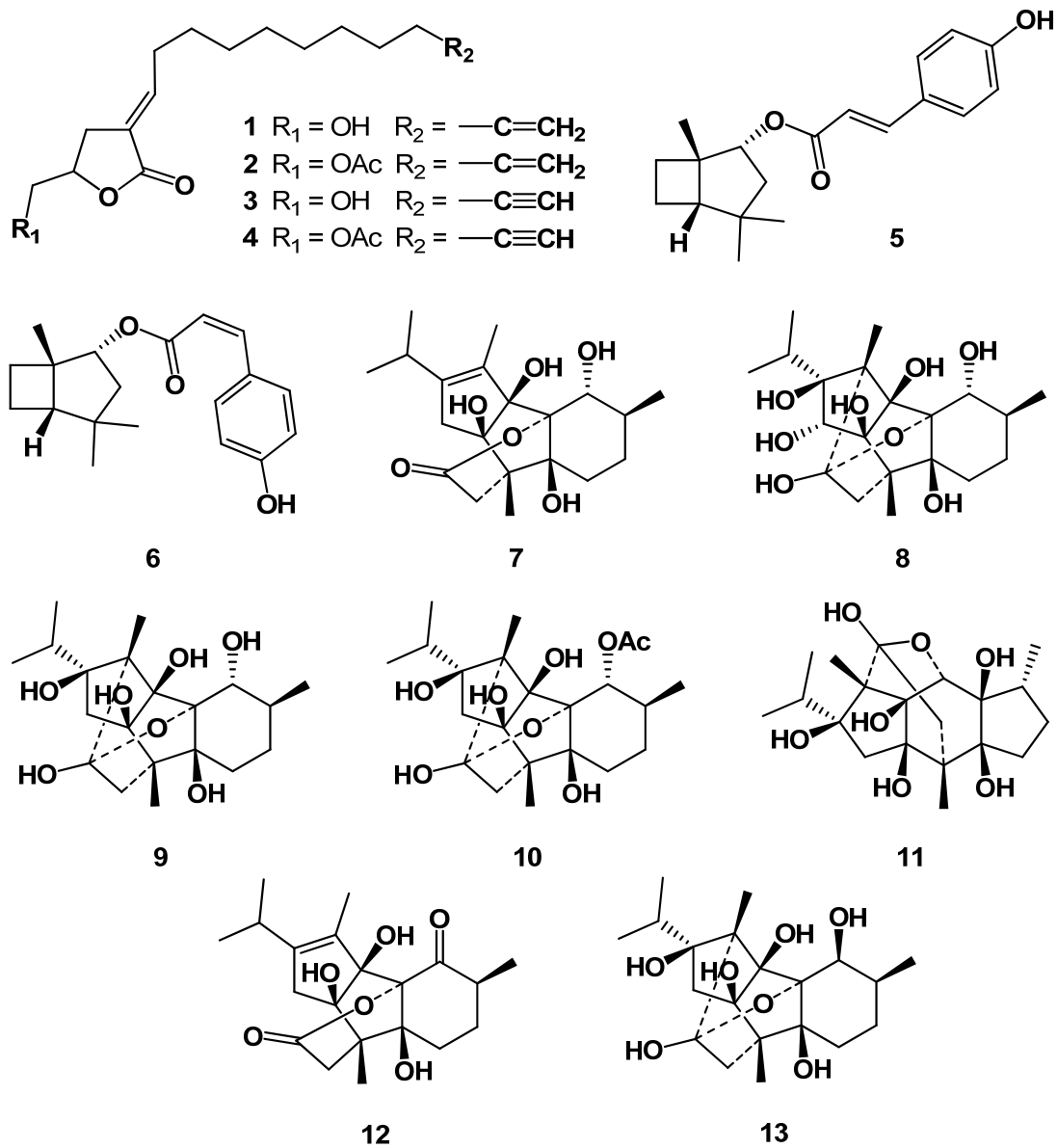
Así mismo, tanto el grado de oxidación de C-3 como la estereoquímica del carbono 14 en los germacranólidos, son determinantes para la actividad biológica de estos compuestos.

16. Los compuestos fenólicos **26**, **28** y **29** son citotóxicos con células CHO, siendo **29** el más activo, mientras que el **27** es antiparasitario con *L. infantum*. La sustitución de un grupo metoxilo por un hidroxilo (C-4') potencia la actividad citotóxica, mientras que la presencia de un grupo metoxilo en lugar de un hidroxilo en C-3' hace que se pierda la actividad antiparasitaria. **27** y **28** son citotóxicos con Sf9, **27** presenta actividad antialimentaria por repelencia con *S. littoralis* y *M. persicae*, y **26** postingestiva con *S. littoralis*. Además, **29** y **27** producen una ligera inhibición de la longitud radicular de *L. sativa*.
17. Los lignanos **30**, **31** y **33** son citotóxicos con Sf9, siendo el **31** el más activo. La actividad es máxima en presencia del grupo trimetoxifenilo y dos anillos tetrahydrofuránicos en la estructura. Esta actividad disminuye con la pérdida de uno de los metoxilos del anillo aromático, y en mayor manera con la apertura de un anillo furánico, incluso en presencia del grupo trimetoxifenilo.
18. Los compuestos **30** y **32** producen un sinergismo moderado con el compuesto **14** en ensayos de citotoxicidad con células Sf9.

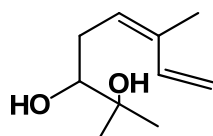
Anexo I

Productos identificados

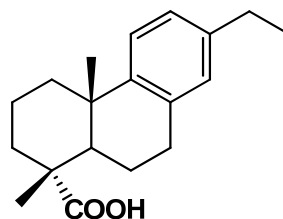
Persea indica



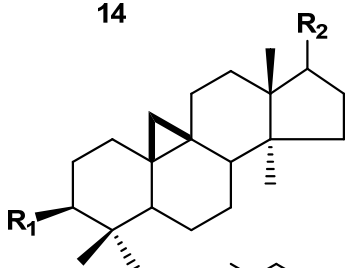
Artemisia absinthium



14



15



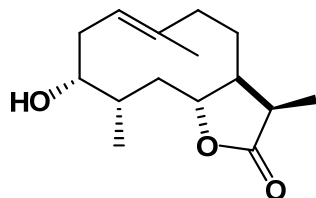
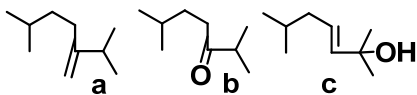
16 $R_1 = OH$ $R_2 = a$

17 $R_1 = OAc$ $R_2 = a$

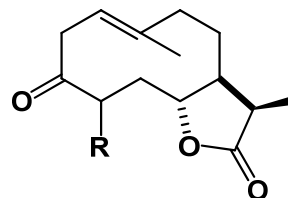
18 $R_1 = OH$ $R_2 = b$

19 $R_1 = OAc$ $R_2 = b$

20 $R_1 = OH$ $R_2 = c$

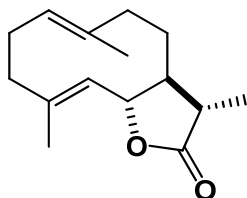


21

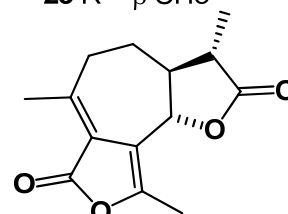


22 $R = \alpha CH_3$

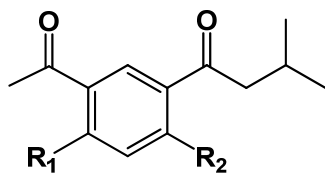
23 $R = \beta CH_3$



24

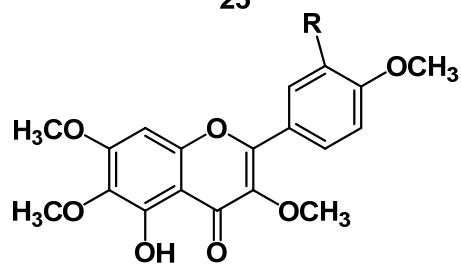


25



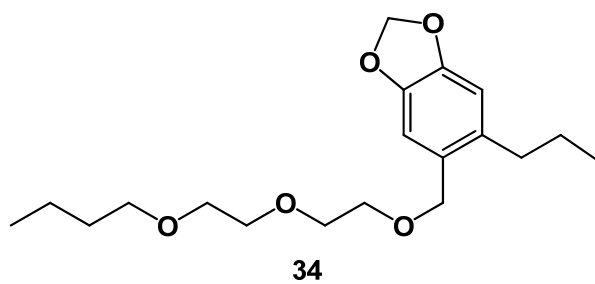
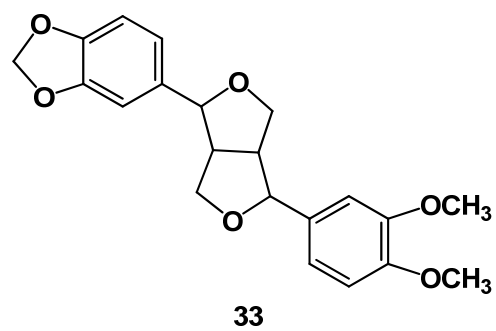
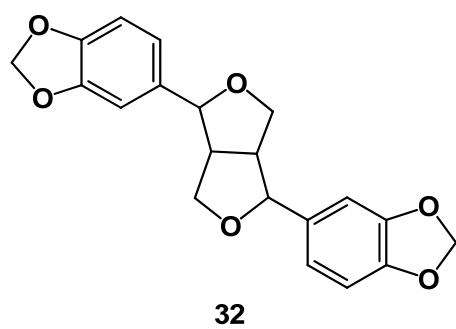
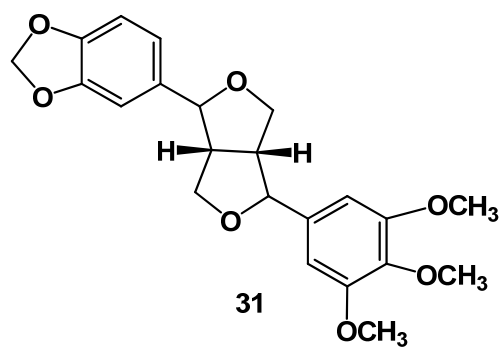
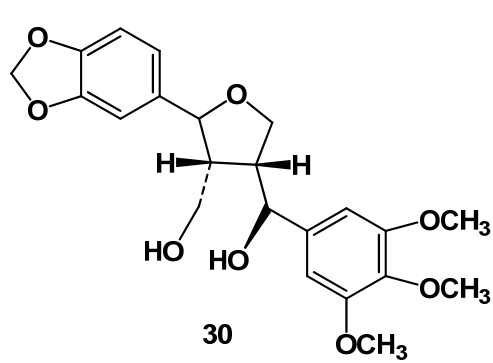
26 $R_1 = OH$ $R_2 = OCH_3$

27 $R_1 = H$ $R_2 = OCH_3$



28 $R = OCH_3$

29 $R = OH$



Anexo II

Listado de extractos y aceites de *Artemisia absinthium*

POBLACIÓN CITA

- **CE02Ae:** aceite esencial de la muestra de Ejea del año 2002.
- **CE03Ae:** aceite esencial de la muestra de Ejea del año 2003.
- **CE04Ae:** aceite esencial de la muestra de Ejea del año 2004.
- **CE05Ae:** aceite esencial de la muestra de Ejea del año 2005.
- **CE06Ae:** aceite esencial de la muestra de Ejea del año 2006.
- **CE03ExA:** extracto de parte aérea de la muestra de Ejea del año 2003.
- **CE05ExA:** extracto de parte aérea de la muestra de Ejea del año 2005.
- **CE06ExA:** extracto de parte aérea de la muestra de Ejea del año 2006.
- **CT02Ae:** aceite esencial de la muestra de Teruel del año 2002.
- **CT03Ae:** aceite esencial de la muestra de Teruel del año 2003.
- **CT04Ae:** aceite esencial de la muestra de Teruel del año 2004.
- **CT05Ae:** aceite esencial de la muestra de Teruel del año 2005.
- **CT06Ae:** aceite esencial de la muestra de Teruel del año 2006.
- **CT02ExA:** extracto de parte aérea de la muestra de Teruel del año 2002.
- **CT05ExA:** extracto de parte aérea de la muestra de Teruel del año 2005.
- **CT06ExA:** extracto de parte aérea de la muestra de Teruel del año 2006.
- **CEFS1:** extracto obtenido con CO₂ supercrítico de la muestra de Ejea 03.
- **CTFS2:** extracto obtenido con CO₂ supercrítico de la muestra de Teruel 03.

POBLACIÓN H

- **H1:** aceite esencial comercial de ajeno (Hausmann Aromatic).
- **H2:** fracción ligera de aceite esencial de ajeno, abundante en terpenos y tujonas (Hausmann Aromatic).
- **H3:** fracción pesada de aceite esencial de ajeno con sesquiterpenos, ésteres y azulenos (Hausmann Aromatic).

POBLACIÓN SN

- **SNC03Ae:** aceite esencial de la muestra de Sierra Nevada cultivada en cámara del año 2003.
- **SNC03ExA:** extracto de parte aérea de la muestra de Sierra Nevada cultivada en cámara del año 2003.
- **SNC03ExR:** extracto de raíces de la muestra de Sierra Nevada cultivada en cámara del año 2003.
- **SNC07ExA:** extracto de parte aérea de la muestra de Sierra Nevada cultivada en cámara del año 2003.
- **SNC07ExR** extracto de raíces de la muestra de Sierra Nevada cultivada en cámara del año 2007.
- **SNI05Ae:** aceite esencial de la muestra de Sierra Nevada cultivada en invernadero del año 2005.
- **SNI05ExA:** extracto de la muestra de Sierra Nevada cultivada en invernadero del año 2005.
- **SNI06ExA:** extracto de la muestra de Sierra Nevada cultivada en invernadero del año 2006.

POBLACIÓN V

- **VAe:** aceite esencial obtenido de una población silvestre de ajeno en Villacampa (Huesca), año 2006.

Abreviaturas

Abreviaturas

- Acn: Acetonitrilo.
- AcOEt: Acetato de etilo.
- AE: Actividad antiepimastigote.
- $[\alpha]_D$: Rotación óptica.
- ANCOVA: análisis de covarianza
- AP: Actividad antipromastigote.
- BYDV: Virus de la hoja manchada de maíz.
- CC: Cromatografía en columna de gravedad (Column Chromatography).
- CCF: Cromatografía en capa fina (Thin Layer Chromatography).
- CECT: Colección Española de Cultivos Tipo.
- CITA: Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón.
- CHCl_3 : Cloroformo.
- CHCl_2 : Diclorometano.
- CHO: Células de ovario de hamster chino.
- ^{13}C NMR: Resonancia magnética nuclear de carbono 13 (^{13}C -Nuclear Magnetic Resonance).
- COSY: Espectroscopía de correlación ^1H - ^1H .
- δ : Desplazamiento químico relativo al TMS.
- DE_{50} : Dosis a la que se produce el 50% del efecto que se mide.
- DMF: Dimetil ftalato.
- DMSO: Dimetil sulfóxido.
- ECACC: Colección Europea de Cultivos Celulares.
- EM: Espectroscopía de masas.
- EMAR: Espectroscopía de masas de alta resolución.
- FR: Índice de consumo (Feeding Reduction).
- GC-MS: Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (Gas Chromatography-Mass Spectrum).

- HMBC: Correlación heteronuclear a multiple enlace ^1H - ^{13}C .
- ^1H NMR: Resonancia magnética nuclear de Protón (^1H Nuclear Magnetic Resonance).
- HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución (High Performance Liquid Chromatography).
- HSQC: Correlación heteronuclear a un enlace ^1H - ^{13}C .
- Hz: Hertzios.
- IE: Impacto electrónico.
- Int. rel.: Intensidad relativa.
- IR: Espectroscopía infrarrojo.
- LC-MS: Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas.
- LIT: Liver Infusion Tryptose.
- L:O: Relación luz y oscuridad.
- MDP: Metilendioxifenilo.
- MeOH: Metanol.
- MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolium bromo.
- MS: Espectro de masas (Mass Spectrum).
- MYF_b: Tintura de yodo.
- m/z: relación carga/masa.
- n-Hex: n-hexano.
- NOESY: Correlación homonuclear bidimensional NOE en sistemas de referencia rotante.
- PBS: Tampón fosfato salino (phosphate buffer saline).
- PDA: Potate dextrose agar.
- P.f. : Punto de fusión.
- PMS: Fenacina metosulfato.
- PSMO: Polisustrato monooxigenasas.
- ppm: Partes por millón.
- rh: Humedad relativa.
- R²: coeficiente de correlación múltiple.
- RI: Índice de repelencia.

- RPMI: Medio de cultivo “Roswell Park Memorial Institute”.
- rpm: Revoluciones por minuto
- SBF: Suero bovino fetal.
- SDS: Dodecil sulfato sódico.
- Sf9: Células de ovario de pupa de *Spodoptera frugiperda*.
- SI: Índice de inhibición del asentamiento (Settling Inhibition Index).
- SPH: Cromatografía de exclusión molecular.
- TMS: Tetrametilsilano
- VLC: Cromatografía líquida de vacío (Vacuum Liquid Chromatography).